



**REGINA MANUEL
SILVA GONÇALVES**

**Caraterização física, química e microbiológica de
*Oryza sativa***

DECLARAÇÃO

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos académicos.



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
Ano 2017

**REGINA MANUEL
SILVA GONÇALVES**

**Caraterização física, química e microbiológica de
*Oryza sativa***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia realizada sob a orientação científica do Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves, Investigador Principal do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e sob co-orientação de Diogo Barbosa Amorim de Lemos, Responsável pela Direção do Departamento de Qualidade da Empresa Novarroz- Produtos Alimentares, S.A.

o júri

presidente

Prof. Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida

Professora auxiliar com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutora Teresa Cláudia Marchão Manso

Gestora de Ciência e Tecnologia Plataforma Tecnológica Agroalimentar e Plataforma Multidisciplinar de Alta Pressão da Universidade de Aveiro

Licenciado Diogo Barbosa Amorim de Lemos

Responsável pela Direção do Departamento de Qualidade da Empresa Novarroz- Produtos Alimentares, S.A.

agradecimentos

Os meus agradecimentos às técnicas de controlo de qualidade da empresa Novarroz, e em especial, ao Diogo Lemos por toda a disponibilidade e orientação ao longo de todo o estágio.

Agradeço ao Doutor Artur Alves e à Doutora Ivonne Delgadillo pela orientação.

Um agradecimento à Elisabete Aguiar que esteve sempre disponível para partilhar os conhecimentos sobre o tema estudado.

Agradeço ao grupo da Alta Pressão pela disponibilização do material de trabalho e ajuda sempre que necessária.

À Patrícia Almeida por toda ajuda e paciência durante o estágio, não poderia ter tido melhor companheira neste percurso.

Por último, aos meus pais e irmão por todo o apoio e paciência.

palavras-chave

arroz, índice glicêmico, germinação, microrganismos, amido, amilose

resumo

O estágio curricular decorreu juntamente com a Novarroz- Produtos Alimentares, S.A.. Esta empresa tem por base o processamento e comercialização de arroz, assim como dos seus subprodutos.

Oryza sativa, popularmente conhecida como arroz, tem uma produção anual de cerca de 740,2 milhões de toneladas em todo o mundo. Tendo em conta as suas propriedades a nível de fonte de energia e de nutrientes, o conhecimento da composição das diferentes variedades e a sua variação consoante o meio onde se encontram é de bastante relevo.

O trabalho desenvolvido teve como objetivo: desenvolver arroz com baixo índice glicêmico e germinado.

O primeiro objetivo dividiu-se na caracterização de 4 amostras de *Oryza sativa*, entre elas variedades integrais e germinadas, tendo em conta o perfil de viscosidade, características físicas, composição química e nutricional. Verificou-se um aumento no conteúdo de amido total, amido resistente e viscosidade final, e uma diminuição de amilose e índice glicêmico das variedades germinadas em relação às variedades testemunho.

O segundo objetivo focou-se na germinação de duas amostras de arroz integral.

A presença de microrganismos é analisada com o objetivo de verificar se são cumpridos os valores para que o arroz seja comercializado e a sua influência nas variedades germinadas. Foi analisado o conteúdo em microrganismos sem imersão, com imersão de uma hora e após germinação. Ocorreu um aumento em microrganismos totais a 30 ° C e Enterobacteriaceae após imersão e germinação. *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, bolores e leveduras não proliferaram e *Salmonella* spp. revelou-se ausente.

Por fim, foi constatada uma relação entre as condições de *stress* da germinação e diminuição de índice glicêmico.

keywords

rice, glycaemic index, germination, microorganisms, starch, amyloses

abstract

The curricular internship occurred with Novarroz- Produtos Alimentares, S.A.. This company has its activity based on the processing and marketing of rice, as well as its by-products. *Oryza sativa*, known as rice, has an annual production of about 740.2 million tons all over the world. Due to its properties of high energy source and nutrients, the knowledge of the composition of the different varieties accordingly to the environment where they are in, is of highly relevance.

The work developed had the purpose of: obtaining rice with low glycaemic index and germinated rice.

The first goal was divided on the characterization of 4 samples of *Oryza sativa*, constituted by brown and germinated rice, according to their viscosity profile, physical characteristics, chemical and nutritional composition. It was verified in germinated varieties an increase in total starch, resistente starch and final viscosity and a decrease in amylose and glycaemic index compared to non-germinated varieties.

The second purpose was the germination of two brown rice samples. The microorganism presence is verified with the aim of checking the rice quality for commercialization and their influence in germination. The matter on microorganism was analysed without soaking, with soaking under water for an hour and after germination. There was an increase in total microorganisms at 30 °C and Enterobacteriaceae after soaking and germination. *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, moulds and yeast did not proliferate and *Salmonella* spp. was absent.

Therefore, it was verified a relation between the conditions of germination and the decrease of the glycaemic index.

Índice

Índice de figuras	iv
Índice de tabelas	vi
Índice de abreviaturas	vii
1. Preâmbulo	1
2. Introdução	3
2.1. Arroz	3
2.2. Segurança alimentar	5
2.2.1. Critérios microbiológicos	5
2.2.2. Microorganismos indicadores	6
2.2.3. Microorganismos patogénicos	7
2.2.4. Microorganismos totais a 30 °C	7
2.2.5. Micotoxinas	8
2.2.6. Análise microbiológica	10
2.2.7. Leveduras	22
2.2.8. Bolores	22
2.3. A planta <i>Oryza sativa</i>	22
2.4. Germinação	24
2.5. Variedades de grãos de arroz	25
2.6. Estado físico do arroz	26
2.7. Tratamento ao qual o arroz é sujeito	27
2.8. Características do grão de arroz	27
2.9. Estrutura e composição do grão	28
2.10. Composição	30
2.10.1. Amido	30
2.10.2. Lípidos	33
2.10.3. Proteínas	34
2.10.4. Aminoácidos	34
2.10.5. Hidratos de Carbono	35
2.10.6. Minerais	36
2.10.7. Vitaminas	36

2.11.	<i>Germinated Brown Rice</i>	36
2.12.	GABA	38
2.13.	Índice glicémico	41
3.	Estágio	46
3.1.	Trabalho desenvolvido na empresa	46
3.2.	Trabalho desenvolvido na Universidade de Aveiro	46
3.3.	Novarroz- Produtos Alimentares, S.A.	47
4.	Material e Métodos	48
4.1.	Amostras de Arroz	48
4.2.	Determinação das características físicas dos grãos de arroz (Novarroz) ..	48
4.3.	Determinação do valor de humidade das amostras (Universidade Aveiro) ..	50
4.4.	Determinação da viscosidade das amostras (Novarroz)	51
4.5.	Determinação do conteúdo em amido total (Universidade Aveiro)	53
4.6.	Determinação do amido resistente (Universidade Aveiro)	54
4.7.	Determinação do conteúdo de amilose (Universidade Aveiro)	56
4.8.	Determinação do índice glicémico (Universidade Aveiro)	56
4.9.	Processo de germinação (Novarroz)	58
4.10.	Análise microbiológica (Novarroz)	58
4.11.	Determinação conteúdo GABA (Universidade Aveiro)	59
5.	Resultados e discussão	60
5.1.	Humidade das amostras	60
5.2.	Relação comprimento-largura	62
5.3.	Análise brancura	65
5.4.	Perfil viscosidade	69
5.5.	Amido total	76
5.6.	Amido resistente	79
5.7.	Amilose	81
5.8.	Índice glicémico	83
5.9.	Germinação	86
5.10.	Identificação microrganismos na germinação	87
5.11.	Quantificação GABA	89
6.	Conclusão	92

7.	Bibliografia	94
8.	Anexos	105
8.1.	Determinação GABA por IC-UV/ VIS.....	105
8.2.	Características físicas	106
8.3.	Perfil viscosidade.....	106
8.4.	Características químicas	107
8.5.	Índice glicémico.....	107
8.6.	Conteúdo em GABA	107
8.7.	Caracterização microbiana	108
8.8.	Correlação entre características.....	108

Índice de figuras

FIG. 1 Maiores exportadores de arroz, em milhões de toneladas, mundialmente em 2016/17 [2].....	3
FIG. 2 Subespécies de <i>Oryza sativa</i> . A) <i>japonica</i> ; B) <i>indica</i>	4
FIG. 3 Estrutura química das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 [33].	9
FIG. 4 Estrutura química de Ocratoxina A [33].....	10
FIG. 5 Planta <i>Oryza sativa</i> . Adaptado de [183].	23
FIG. 6 Fases de germinação de <i>Oryza sativa</i> [87].	25
FIG. 7 Diferenciação dos diversos grãos de arroz [24].....	26
FIG. 8 Ilustração de um grão de arroz. Adaptado de: [92].....	28
FIG. 9 Representação dos grânulos de amido e corpos proteicos no grão de arroz na camada de subaleurona do endosperma. Adaptado de [7].	29
FIG. 10 A) Estrutura da amilose, B) Estrutura da amilopectina. Adaptado [100].	32
FIG. 11 Fermentação de polissacarídeos com a obtenção de butirato, por bactérias [108].....	33
FIG. 12 Reação de descarboxilação de L-glutamato pela enzima GAD que origina GABA [136].	41
FIG. 14 Equipamento S21 <i>Rice Statistic Analyser</i>	49
FIG. 15 Modelo medidor de brancura <i>Kett</i> C300/C100.....	50
FIG. 16 Equipamento <i>Rapid Visco Analyser</i> , modelo TecMaster.....	52
FIG. 17 Curva típica de RVA, obtida após a realização de um teste [184].	52
FIG. 18 Microplaca de leitura de absorvância para análise do amido total.	54
FIG. 19 Microplaca de leitura de absorvância de amido resistente.	55
FIG. 20 Espectro padrão de GABA puro [169].	59
FIG. 21 Gráfico referente aos valores de humidade (%) das amostras em matéria seca.	60
FIG. 22 Gráfico referente à comparação entre os valores de humidade (%), em matéria seca, obtidos sem e com imersão de uma hora.	61
FIG. 23 Comprimento (mm) e largura (mm) das amostras.....	62
FIG. 24 Correlação do coeficiente de <i>Pearson</i> entre o comprimento e a largura das amostras.....	63
FIG. 25 Relação comprimento-largura (mm) das amostras.	63
FIG. 26 Correlação do coeficiente de <i>Pearson</i> entre o comprimento e a relação comprimento-largura das amostras.....	64
FIG. 27 Correlação do coeficiente de <i>Pearson</i> entre a largura e a relação comprimento-largura das amostras.	64
FIG. 28 Valor de <i>Kett</i> das amostras.....	65
FIG. 29 Valores de brancura vítrea, brancura total e % de área gessada das amostras.....	66
FIG. 30 Correlação entre brancura total e brancura vítrea das amostras.....	66
FIG. 31 Correlação do coeficiente de <i>Pearson</i> entre brancura total e área gessada (%).	67
FIG. 32 Correlação do coeficiente de <i>Pearson</i> entre brancura total e <i>Kett</i> das amostras.	67

FIG. 33 Correlação do coeficiente de <i>Pearson</i> entre <i>Kett</i> e área gessada (%) das amostras.....	68
FIG. 34 Correlação do coeficiente de <i>Pearson</i> entre área gessada (%) e brancura vítrea das amostras.	68
FIG. 35 Resultados pico da viscosidade das amostras, obtido pelo RVA.	71
FIG. 36 Resultados da vala das amostras, obtido pelo RVA.	71
FIG. 37 Resultados viscosidade final das amostras, obtido pelo RVA.....	72
FIG. 38 Resultados <i>breakdown</i> das amostras, obtido pelo RVA.	72
FIG. 39 Resultados da retrogradação das amostras, obtido pelo RVA.	73
FIG. 40 Resultados tempo do pico das amostras, obtido pelo RVA.....	73
FIG. 41 Resultados da <i>pasting temperature</i> obtidos na análise das variedades por RVA.	74
FIG. 42 Representação gráfica dos resultados obtidos no RVA das variedades controlo e germinadas.	74
FIG. 43 Amido total (%), em matéria seca das amostras.....	77
FIG. 44 Comparação do valor de amido total (%) das amostras, em matéria seca, sem e com uma hora de imersão.	78
FIG. 45 Amido resistente (%), em matéria seca, das amostras.	79
FIG. 46 Comparação valores amido resistente (%) das amostras, em matéria seca, sem e com uma hora de imersão.	80
FIG. 47 Conteúdo em amilose (%), em matéria seca, das amostras.	81
FIG. 48 Comparação conteúdo amilose (%) das amostras, sem e com imersão após uma hora.....	82
FIG. 49 Índice glicémico das amostras.	84
FIG. 50 Comparação dos valores das amostras entre o índice glicémico e o índice glicémico após uma hora de imersão.	84
FIG. 51 Grão de arroz <i>indica</i> antes da germinação (A) e após a germinação (B).	86
FIG. 52 Grão de arroz <i>japonica</i> antes da germinação (A) e após a germinação (B).	86
FIG. 52 Representação da quantidade de GABA (mg/kg) obtida nas variedades testemunho (Indica 7- T e Japonica 16-T) e nas variedades germinadas (Indica 7-G e Japonica 16-G).	90

Índice de tabelas

Tabela 1 Composição, em percentagem na matéria seca, do arroz integral e branco polido [11].	30
Tabela 2 Conteúdo em aminoácidos em arroz integral e branqueado [2].	35
Tabela 3 Bactérias do trato intestinal associadas com a presença/ausência de Diabetes tipo 2. Adaptado de: [153].	44
Tabela 4 Amostras de arroz para análise fornecidas pela Novarroz- Produtos Alimentares, S.A..	48
Tabela 5 Ciclo de tempo e temperatura necessários para se obter o perfil de viscosidade de <i>Oryza sativa</i>	53
Tabela 6 Resultados das análises realizadas às amostras referentes ao <i>kett</i> , brancura vítrea, brancura total e área gessada (%).	66
Tabela 7 Ciclo de tempo e temperatura necessários para se obter o perfil de viscosidade de <i>Oryza sativa</i>	69
Tabela 8 Resultados obtidos nos parâmetros do perfil de viscosidade (pico, vala, <i>breakdown</i> e viscosidade final) das quatro amostras analisadas.	70
Tabela 9 Resultados obtidos nos parâmetros do perfil de viscosidade (retrogradação, tempo do pico e <i>pasting temperature</i>) das quatro amostras analisadas.	70
Tabela 10 Valores de microrganismos controlo e presentes nas análises sem imersão, com imersão durante uma hora e após germinação.	87

Índice de abreviaturas

AACC	<i>American Association Of Cereals Chemistry</i>
AUC	<i>Area Under Curve</i>
AVC	Acidente Cardiovascular
API	<i>Analytical Profile Index</i>
Aw	Atividade De Água
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DAS	Diacetoxiscirpenol
DON	Desoxinivalenol
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FAM	Complexos Amilose Livres
FAO	Organização Para A Alimentação, Agricultura Das Nações Unidas
FTIR	<i>Fourier-Transform Infrared Spectroscopy</i>
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
GAD	<i>Glutamic Acid Decarboxylase</i>
GBR	<i>Germinated Brown Rice</i>
GOD-POD	<i>Glucose Oxidase-Peroxidase</i>
HACCP	<i>Hazard Analysis And Critical Control Points</i>
HI	Índice Hidrólise
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IC-UV/VIS	<i>Ultraviolet–Visible Spectroscopy</i>
IG	Índice Glicémico
ISO	<i>International Organization of Standardization</i>
LAB	<i>Lactic acid bacteria</i>
LAM	Complexos Amilose-Lipídicos
LPS	Lipopolissacarídeos
NIV	Nivalenol
OMC	Organização Mundial De Comércio
OMS	Organização Mundial De Saúde
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>

PFGE	Electroforese Em Gel De Campo Pulsado
RAPD	Realização De Análises Polimórficas De DNA
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
RVA	<i>Rapid Visco Analyser</i>
UFC	Unidade De Formação De Colónias

1. Preâmbulo

Este relatório foi desenvolvido no âmbito do mestrado em Microbiologia na Universidade de Aveiro, em associação com a Novarroz- Produtos Alimentares, S.A., com o objetivo de desenvolver arroz com baixo índice glicémico e obter arroz germinado com elevado conteúdo em ácido gama-aminobutírico (GABA).

O ponto presente refere uma caracterização do trabalho realizado e quais eram os seus objetivos. O ponto 2 fornece a revisão da literatura tendo em conta os tópicos que foram estudados. No ponto 3 há uma descrição do que foi realizado durante o estágio na empresa. O ponto 4 indica o material e métodos a que se recorreu para se realizar a investigação. No ponto 5 divulgam-se os resultados obtidos que são depois discutidos no ponto 6. No ponto 7 conclui-se sobre os resultados da investigação desenvolvida.

O estágio foi realizado com a intenção da empresa procurar corresponder às necessidades do consumidor. O melhor modo de corresponder às mesmas é a realização de investigação.

A Novarroz- Produtos Alimentares, S.A., tem como maior atividade o processamento e comercialização de diferentes variedades de arroz, assim como dos seus subprodutos [1]. De modo a se atingir evolução e crescimento económico nesta área, também é necessário possuir conhecimentos que permitam responder às necessidades do consumidor. Para que isso aconteça, é indispensável o desenvolvimento de conhecimentos em relação às variedades e no modo em que como se podem gerar novos produtos.

O estágio permitiu adquirir experiência profissional, compreensão das políticas da empresa e conhecimento do processamento da matéria prima desde a sua chegada até à sua exportação. A parte do estágio que decorreu na empresa, mais precisamente no laboratório de controlo de qualidade, focou-se na análise das características físicas do arroz e dos seus subprodutos. A segunda parte, que decorreu nos laboratórios da Universidade de Aveiro, teve como objetivo a realização de investigação.

Assim, o trabalho realizado foi dividido em duas partes distintas. A primeira parte consistiu na caracterização de variedades de arroz integral e germinado. Esta caracterização incluiu a análise física, determinação da viscosidade e análises para determinação da composição química. A composição química incluía a determinação da humidade, amido total, amido resistente, amilose e índice glicémico. A segunda parte compreendeu no

processo de germinação de duas variedades de arroz integral, com o objetivo de aumentar o teor em GABA (ácido gama-aminobutírico) do grão. O conteúdo em GABA foi depois determinado por FTIR e IC/UV-VIS, de modo a verificarem-se as alterações que ocorreram durante a germinação.

2. Introdução

2.1. Arroz

O arroz, *Oryza sativa*, é uma das principais culturas de cereais do mundo e a base da alimentação de mais de metade da população mundial [2]. Juntamente com o milho e o trigo, o arroz é dos grãos mais consumidos no mundo [3].

Anualmente são produzidas cerca de 740,2 milhões de toneladas em todo o mundo (FAO, 2015) [2]. Mundialmente, entre os maiores exportadores de arroz encontram-se a Índia, Tailândia, Vietname, Paquistão e Estados Unidos da América, como se pode observar na FIG.1 [4]. Os maiores consumidores mundiais encontram-se no continente Asiático [3].

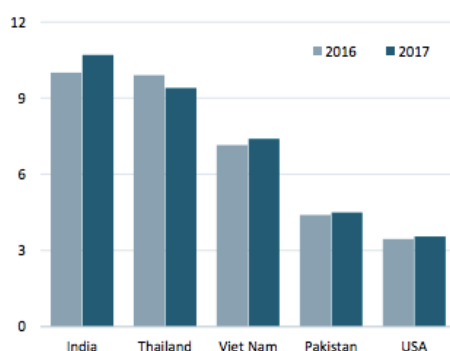


FIG. 1 Maiores exportadores de arroz, em milhões de toneladas, mundialmente em 2016/17 [2].

Portugal é caracterizado como um dos maiores consumidores de arroz *per capita* na União Europeia, com um consumo de cerca de 16kg por habitante, de arroz branqueado e semi-branqueado [5].

Nacionalmente, o arroz carolino é a variedade mais produzida e característica. No entanto, não se apresenta como o mais consumido no país, havendo uma maior incidência no consumo de arroz de grão longo, agulha [5].

O arroz faz parte da família Gramineae, no qual existem 23 espécies diferentes do mesmo [6]. No entanto, apenas duas destas espécies são cultiváveis: *Oryza sativa* e *Oryza glaberrima*. A espécie *Oryza sativa* divide-se em três subespécies: *indica*, *japonica* e *javanica*. Acredita-se que *Oryza sativa* diferenciou-se nestas subespécies devido a terem evoluído em diferentes regiões: Índia, China e Indonésia, respetivamente [7]. As subespécies mais comuns são *indica* e *japonica* [6], que se podem observar na FIG. 2 A, no caso de

japonica, e FIG. 2 B, no caso de *indica*.

A subespécie *indica* cresce em planícies da zona tropical da Ásia, enquanto que a *japonica* cresce em planaltos do sudoeste Asiático. A distinção entre estas duas subespécies ocorre no formato do grão, reação fenólica, cor da folha. No entanto, não é possível a distinção pela variação do espectro, já que este se sobrepõe nas duas subespécies [8].

O arroz sofreu uma dispersão de ambientes tropicais na Ásia para ambientes com maiores altitudes e latitudes. Posteriormente, foi introduzido nos Estados Unidos da América, Austrália e África nos últimos séculos [9]. Desde o século oitavo que existe o cultivo de arroz em Espanha e Portugal, e um século mais tarde iniciou-se no sul de Itália [9]. A dispersão mundial ocorreu devido à flexibilidade que esta planta tem em ser cultivada a diferentes temperaturas, tipos de solo e valores de humidade [3].

Para ser considerado próprio para consumo e poder ser destinado a transformação industrial, o arroz requer determinadas características organoléticas. É necessário ter em atenção a coloração e estado de conservação do arroz, que esteja isento de alterações, sinais de parasitação animal ou vegetal, de microrganismos patogénicos e/ou substâncias derivadas destes [10].

O arroz pode ser separado da casca e transformar-se em arroz integral na descascadora. O arroz integral pode ser posteriormente transformado em branqueado ao ser-lhe retirado o pericarpo do grão. Este é essencialmente constituído por endosperma, dependendo a sua quantidade sempre do grau de branqueamento ao qual é sujeito [3].

Os constituintes do arroz têm sido relacionados a efeitos benéficos na saúde. Alguns destes benefícios são o auxílio no controle da glicose sanguínea, redução da pressão arterial, prevenção de diabetes e doenças cardiovasculares [11].



FIG. 2 Subespécies de *Oryza sativa*. A) *japonica*; B) *indica*.

2.2. Segurança alimentar

A contaminação microbiológica do arroz pode ocorrer em qualquer um dos processos pelo qual é sujeito, desde colheita, transporte, armazenamento, processamento e acondicionamento [12]. Além disso, pode também ocorrer nos meios onde estão inseridos os produtos, como solo e água, e pelo contacto com o ar [12].

Apesar de poderem surgir contaminações em diversos ambientes, os microrganismos apenas se desenvolvem se as condições biológicas do arroz assim o permitirem [12]. A quantidade de água livre disponível no arroz, ou seja, água disponível para os processos metabólicos, é uma das propriedades com elevado relevo no desenvolvimento microbiano [14].

Devido à elevada possibilidade de contaminação a que o arroz pode estar sujeito, existem padrões de controle de qualidade. A Comissão do *Codex Alimentarius* incutiu critérios de segurança e qualidade para o consumo humano de arroz, e limites máximos para micotoxinas, resíduos de pesticidas e metais pesados [92]. Em 1995 estes critérios foram aceites pela Organização Mundial do Comércio (OMC), Organização para a Alimentação, Agricultura das Nações Unidas (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) [92].

2.2.1. Critérios microbiológicos

Os critérios microbiológicos são um controlo de riscos que indicam a aceitabilidade de um alimento, ou de um processo alimentar ou medida de controlo alimentar, tendo em conta os microrganismos, sua ausência ou presença, suas toxinas ou metabolitos associados a patogenicidade, por unidade de massa, área, volume ou lote [13].

O critério microbiológico é constituído pelo seu objetivo, qual o processo alimentar ao qual este se aplica, qual o ponto na cadeia do processo alimentar no qual se insere. Também se foca nos microrganismos, qual a razão da sua seleção, os seus limites no produto analisado. Por fim, em qual a quantidade das amostras a serem analisadas e parâmetros de análise estatística [14].

A escolha de qual o critério microbiológico a ser empregue depende do tipo de alimento, ingredientes utilizados e seu estado, processamento, manuseamento, embalagem, distribuição e armazenamento [15].

Estes critérios servem para avaliar microbiologicamente os alimentos em todas as fases do seu processamento, através da comparação com o limite específico para o microrganismo e alimento no qual está presente. É assim definido se um produto alimentar pode ser consumido [13].

A utilização destes critérios é realizada tanto pelos organismos oficiais como pelos operadores alimentares, para controlo do funcionamento do sistema de gestão de segurança alimentar, como HACCP, e boas práticas de higiene [16].

2.2.2. Microrganismos indicadores

Os microrganismos podem-se dividir em microrganismos indicadores, patogénicos e totais a 30°C. Os microrganismos indicadores expressam a qualidade higiénica, que no caso de se apresentarem em valores elevados demonstra más práticas, podendo haver presença de microrganismos patogénicos [17].

Existem critérios para a definição de microrganismos indicadores. Estes são um ser facilmente quantificado, detetável e distinguível dos que fazem parte do microbiota do alimento, não ser contaminante do alimento, estar presente quando o patogénico também estiver, estar ausente quando não há patogénico (ou em quantidades mínimas), possuir taxa de crescimento e de morte equivalente à do patogénico, ter como habitat o trato intestinal de animais e do homem, existirem técnicas de deteção e contagem simples e rápidas [17].

Tendo em conta a ICMSF, *International Commission on Microbiological Specifications for Foods*, os microrganismos indicadores podem ser divididos nos que não oferecem riscos à saúde do consumidor como psicrotróficos, termófilos, mesófilos, bolores e leveduras, e nos que oferecem risco indireto ou baixo à saúde do consumidor como coliformes fecais enterococos, coliformes totais, enterobactérias totais e *Escherichia coli* [18].

Em Portugal, os microrganismos indicadores são *E. coli*, *Listeria* spp., anaeróbios sulfito redutores, bolores, leveduras e coliformes [16].

2.2.3. Microrganismos patogénicos

Os microrganismos patogénicos são os microrganismos que possuem a capacidade de gerar doenças do fórum alimentar [16]. Apresentam uma taxa de crescimento máxima à temperatura do corpo humano, sendo o seu hospedeiro favorável à sua sobrevivência e proliferação. Estes microrganismos produzem compostos tóxicos que posteriormente podem ser transmitidos pelo consumo dos alimentos, ar ou através da manipulação do produto alimentar [19].

Fatores como medidas de prevenção e capacidade de deteção influenciam a existência e transmissão de microrganismos patogénicos nos produtos alimentares [19].

Existem alimentos como os bivalves que possuem naturalmente microrganismos patogénicos, e outros que são contaminados com água quando são lavados ou cozinhados a baixas temperaturas. A água, é assim, uma via pela qual a contaminação é mais suscetível visto estar presente em várias fases do processamento e preparação do alimento [20]. Posterior ao processamento, a contaminação pode ocorrer por más práticas de higiene, contaminação cruzada ou refrigeração incorreta [21].

Os microrganismos patogénicos alimentares são transmitidos ao ser humano através do solo, ervas, contacto com animais ou ingestão de alimentos ou água contaminada [21].

Em Portugal os microrganismos que estão identificados como patogénicos são *Estafilococos coagulase positiva*, *Bacillus cereus*, *Campylobater spp.*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp*, *Vibrio cholerae* e *Vibrio parahaemolyticus* [16].

2.2.4. Microrganismos totais a 30 °C

Os microrganismos totais a 30 °C fornecem uma indicação geral da qualidade que os alimentos apresentam. A partir desta contagem é possível obter uma estimativa dos microrganismos anaeróbios facultativos ou aeróbios presentes num produto alimentar, sem especificar o género ou espécie. Deste modo, esta contagem não permite inferir quais os microrganismos patogénicos presentes [16].

Com estes resultados sabe-se se os produtos foram manipulados corretamente, assim como se seguiram as normas de boas práticas de higiene [22].

2.2.5. Micotoxinas

A presença de micotoxinas no arroz tem de corresponder aos limites impostos pela regulamentação, Regulamento (CE) n. o 1881/2006 da Comissão, de 19 de Dezembro de 2006, [23], e Regulamento (EU) n. o 165/2010 da Comissão, de 26 de Fevereiro de 2010 [24] sendo estas a aflatoxina B1 e ocratoxina A.

As micotoxinas são toxinas produzidas por fungos filamentosos [25]. São considerados metabolitos secundários com moléculas que variam de anéis heterocíclicos com peso molecular até 50 Da, a grupos de 6 a 8 anéis heterocíclicos dispostos irregularmente com peso molecular total superior a 500 Da, não apresentando imunogenicidade. Existem cerca de 400 tipos diferentes de micotoxinas [26].

A contaminação por micotoxinas pode ocorrer direta ou indiretamente. A indireta acontece após a contaminação por fungos e, mesmo depois da sua eliminação, as micotoxinas produzidas continuam no produto. A contaminação direta acontece quando o produto é contaminado por um fungo com posterior formação de micotoxinas [27].

A colonização e contaminação de alimentos por parte das micotoxinas pode ocorrer durante a pré-colheita, colheita ou armazenamento dos mesmos [27]. Para que ocorra a produção de micotoxinas são necessárias condições fisiológicas diferentes daquelas que são precisas para a proliferação de fungos. Os fungos que colonizam os alimentos na fase da pré-colheita crescem a temperaturas entre 20 e 25 °C, e com atividade de água (aw) superior a 0.85, sendo o valor para crescimento ótimo de 0.99, e humidades entre 70 e 90%. Fungos que podem contaminar nesta fase são dos géneros *Cladosporium* e *Fusarium* [27]. Na fase de armazenamento, os fungos que podem contaminar os alimentos estão adaptados a condições de temperatura mais elevadas e aw mais baixas. Esta contaminação é mais frequente por parte de *Aspergillus* e *Penicillium*, que são capazes de se proliferar em ambientes com aw a partir de 0.75 [28].

As aflatoxinas podem-se dividir em B1, B2, G1 e G2 (FIG. 3). Esta divisão tem em conta a sua fluorescência quando são sujeitas a luz ultravioleta, as B ficam azuis e as G ficam

verdes, e a sua mobilidade durante a realização de cromatografia [25]. A mais abundante e mais tóxica é a B, por ser o produto natural mais carcinogénico de que se tem conhecimento [27]. Estas micotoxinas possuem a capacidade de se ligarem ao DNA das células e afetar a síntese proteica e imunidade celular [29].

Estas micotoxinas são produzidas por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. pseudotamari* e *A. ochraceoroseus*. Das estirpes de *Aspergillus flavus*, 50% são produtoras de aflatoxinas [30]. Substratos como sementes, cereais, amendoins, frutos secos e especiarias são contaminados por aflatoxinas. As culturas aéreas, como é o caso do milho, são contaminadas por *A. flavus*, enquanto que culturas que entrem em contacto com o solo, como amendoins, são contaminadas por *A. flavus* e *A. parasiticus* [31]. A contaminação além de poder ocorrer na colheita, também pode decorrer no armazenamento devido às condições de humidade e temperatura [32].

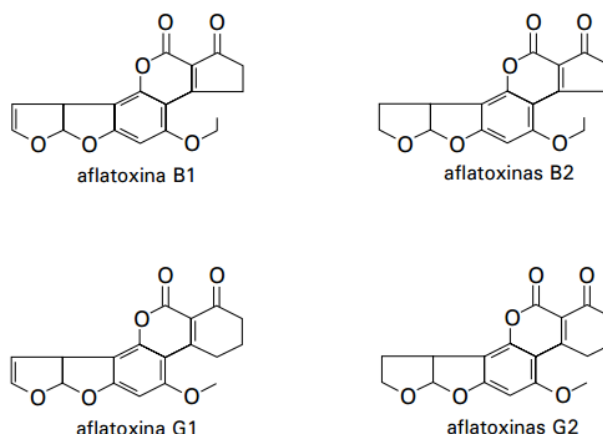


FIG. 3 Estrutura química das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 [33].

A ocratoxina A pode ser encontrada no vinho tinto, café, frutos secos e, principalmente, nos cereais [27]. As espécies *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus auricomus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus meleus* e *Aspergillus niger*, *Penicillium nordicum* e *Penicillium verrucosum* são as responsáveis pela produção desta micotoxina [34], [35].

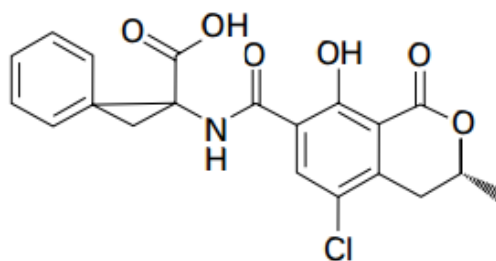


FIG. 4 Estrutura química de Ocratoxina A [33].

A estrutura química da Ocratoxina A (FIG. 4) possui uma isocumarina ligada a um grupo L-fenilalanina, semelhante à das aflatoxinas [25]. Esta micotoxina além de nefrotóxica, imuno-supressora e hepatóxica também é um possível cancerígeno humano, daí a necessidade de ser detectada nos produtos alimentares [36].

As aflatoxinas do tipo B1 podem estar presentes com teor máximo de 2.0 µg/kg, e teor máximo do somatório de B1, B2, G1 e G2 de 4.0 µg/kg [23].

A ocratoxina A pode ser encontrada no arroz com teor máximo de 5.0 µg/kg no caso de arroz integral e 3.0 µg/kg no caso do branqueado.

A presença de metais pesados como o chumbo e o cádmio é apenas admissível quando é respeitado o teor máximo regulamentado. O chumbo pode estar presente com teor máximo de 0.20 mg/kg. O cádmio pode-se apresentar até atingir um teor máximo de 0.20 mg/kg [23].

A presença de arsénio inorgânico tem como teor máximo em baby food de 0.1 µg/kg, 0.25 µg/kg em arroz integral e vaporizado, e 0.2 µg/kg em arroz branqueado [37].

2.2.6. Análise microbiológica

Não existe uma legislação que indique a diversidade e o valor de microrganismos, em UFC/g, que podem estar presentes no arroz. Deve ser verificado, em análises, a presença de microrganismos que afetem cereais e que se saiba serem prejudiciais ao consumidor. Na sua presença, cada indústria alimentícia estabelece um limite para que no caso de serem ingeridos aquando do consumo do produto alimentar, não serem nocivos [38].

O desenvolvimento e proliferação microbiana depende do tipo de substrato que constitui o alimento, local de armazenamento e quantidade de água livre disponível no produto. No caso dos grãos de arroz são analisados microrganismos como *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, Enterobactérias, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Streptococcus* e *Pseudomonas* [12]. Na microbiota da farinha de arroz, podem-se encontrar grupos microbiológicos de *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* e *Salmonella* [12].

A disseminação destes microrganismos ocorre por fatores extrínsecos e intrínsecos aos alimentos. Os fatores extrínsecos são a humidade, temperatura e a composição da atmosfera. Os fatores intrínsecos são composição química, potencial oxidação-redução, pH e atividade da água (*aw*) [39].

Bacillus cereus é um Gram-positivo, pertencente à família Bacillaceae, que habita no solo, sendo uma presença ubiqüitária na natureza. Devido a esta presença, pode ser encontrado em diversos alimentos. Quando existe falta de nutrientes para a sua sobrevivência produz esporos, formados pelo processo de esporulação, que são capazes de resistir a falta de água, elevadas e reduzidas temperaturas, e, exposição a produtos químicos [12]. Em relação ao nível de atividade de água (*aw*), o seu crescimento ocorre entre 0.92 e 0.95. Os esporos conseguem sobreviver em ambientes com reduzida atividade de água durante um longo período de tempo, e com temperaturas dos 5 aos 55 °C. Em relação ao valor de pH, *Bacillus cereus* tem valor limite mínimo de 4.9 e máximo de 8.8. Em ambientes com NaCl superior a 7.5% ocorre uma inibição do crescimento deste microrganismo [39]. A temperatura ótima de multiplicação destes microrganismos é entre 25 a 37 °C, sendo capaz de se desenvolver com temperatura mínima de 4 °C e temperatura máxima de 55 °C [40]. Em relação ao valor de pH, consegue crescer em ambientes entre 5.0 e 9.3, sendo a taxa específica de crescimento máxima atingida em valores de 6.0 e 7.0. *Bacillus cereus* tem dificuldade a crescer em ambientes com ácido acético. A toxina emética produzida por este encontra-se estável em ambientes com pH entre 2 e 11. Por outro lado, a toxina diarreica é estável entre valores de pH de 4 a 11 [40]. *Bacillus cereus* é uma bactéria anaeróbia facultativa, no entanto a produção de toxinas não ocorre em condições de anaerobiose. Quando expostos a radiação para a sua irradicação os esporos de *Bacillus cereus* são mais resistentes que as células vegetativas [39].

A contaminação dos consumidores por *Bacillus cereus* pode ocorrer devido ao armazenamento incorreto ou pelo consumo de arroz pré-cozinhado [41]. Após o cozimento e pasteurização, a permanência dos alimentos, tal como o arroz, a uma temperatura entre 25 e 30 °C, leva a que os esporos germinem, já que o cozimento destrói as células vegetativas, mas não os esporos resistentes ao calor. Tendo em conta a grande estabilidade da toxina emética (termoestável), mesmo que o arroz seja frito e aquecido, esta não é destruída. A inativação da toxina só ocorre se for submetida a 100 °C durante 25 minutos [42]. A presença de uma quantidade de microrganismos, superior a 1.0^6 UFC/g, no arroz, indica uma proliferação da população bacteriana e produção da toxina emética que pode levar à contaminação dos consumidores. A confirmação laboratorial faz-se por isolamento da bactéria nas fezes do doente ou isolamento de 1.0^5 UFC/g, ou mais, no alimento que se considera comprometido. O surto é associado a náuseas e vômitos após a ingestão de arroz cozinhado, entre a primeira e quinta hora [21].

De modo a impedir a proliferação destes microrganismos, germinação dos esporos e crescimento das células vegetativas, o arroz, depois de cozido, deve ser arrefecido rapidamente para atingir os 4 °C ou mantido acima dos 65 °C [39]. *Bacillus cereus* está associado a infeções sistémicas e locais, que incluem bacteriemia fulminante, abscessos cerebrais e meningite, pneumonia, endoftalmite e infeções cutâneas [43].

As técnicas de microbiologia tradicionais para identificação destes microrganismos baseiam-se na subtipagem e identificação de géneros, espécies e subespécies. No entanto apresentam como desvantagens uma grande variabilidade de resultados, baixo poder discriminatório e possível má interpretação dos resultados [44]. Para além destes métodos tradicionais, utiliza-se o PCR, no qual se recorre à amplificação “*in vitro*” dos ácidos nucleicos, conseguindo-se identificar as estirpes microbianas isoladas, de modo a que estas sejam detetadas em alimentos. Tem como vantagens possuir deteção de bactérias não detetáveis em meio de cultura, maior poder de discriminação, maior especificidade, maior seletividade e maior rapidez na obtenção de resultados. Por outro lado, a presença de inibidores da enzima polimerase em determinados alimentos pode causar interferência no processo, e pode não ser capaz de distinguir células vivas de células mortas [44].

Staphylococcus é uma bactéria Gram-positivo, pertencente à família Staphylococcaceae, imóvel, com diâmetro que apresenta valores entre 0.5 e 1.5 µm. As colónias que se formam são circulares apresentando entre 3 a 5 mm [45]. Crescem melhor em condições aeróbias,

sendo anaeróbias facultativas. São quimiorganotróficos com metabolismo fermentativo e respiratório. Possuem temperatura de crescimento entre 7 e 48 °C, com temperatura ótima de 37 °C, sendo caracterizadas como mesófilas. Produzem enterotoxinas entre 10 a 46 °C, com temperatura ótima entre 40 a 45 °C. São capazes de crescer em ambientes com pH entre 4.0 e 9.8 e atividade de água (aw) mínima de 0.86 [46]. São resistentes a um ambiente com conteúdo de sal até 10% [45]. Este género encontra-se no microbioma nasal, na pele, produtos alimentares, água e pó. A produção, por parte destes microrganismos, de enterotoxinas é responsável por infeções oportunistas em animais e humanos [47]. *Staphylococcus* coagulase positiva também são capazes de produzir enterotoxinas, daí ser importante a pesquisa das mesmas nos alimentos. São conhecidas sete espécies com esta característica, sendo elas *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. schleiferi*, *S. hyicus*, *S. lutrae*, *S. delphini* e *S. pseudintermedius* [48]. As enterotoxinas estafilocócicas são de cariz proteico e possuem baixo peso molecular e cadeia única, podendo se distinguir em seis grupos: A, B, C1, C2, D e E. São toxinas termoestáveis, capazes de resistir a condições de temperatura de 100 °C. Estas são produzidas por *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. xylosus* e *S. epidermidis* [48].

A contaminação de alimentos dá-se pelo manuseamento dos mesmos por alguém que se encontra infetado [49]. Quando a intoxicação ocorre por ingestão de alimentos deve-se ao facto de não terem sido mantidos acima de 60 °C ou abaixo de 7.2 °C [50]. Quando o consumidor ingere esta toxina pode sofrer de vômitos, náuseas e diarreia. Dependendo da quantidade ingerida a reação poderá agravar-se [51]. A dose necessária para que haja sinais de intoxicação é inferior a 1.0 µg do alimento contaminado que corresponde a uma população superior a 1.0⁵ UFC/g [49].

Métodos para a identificação destes microrganismos e sua toxina têm sido desenvolvidos [52], [53]. Pode-se recorrer à fagotipagem quando for possível isolar estafilococos dos alimentos suspeitos de estarem contaminados. Também é possível realizar-se separação das toxinas dos restantes constituintes do alimento recorrendo-se a antienterotoxina. Para este método pode-se optar pela adsorção seletiva da enterotoxina do alimento ou remoção dos componentes alimentares permanecendo em solução a toxina. Estas técnicas permitem a deteção de pequenas quantidades [53]. Além destes métodos, também se pode recorrer a outros mais rápidos como ELISA, procedimento que se baseia em anticorpos monoclonais, e que pode detetar cerca de 1.0 ng de toxina por grama de alimento [54].

A família Enterobacteriaceae possui mais de 30 géneros e cerca de 100 espécies, tendo 25 delas importância clínica. Alguns dos géneros incluídos nesta família são *Enterobacter*, *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia* e *Shigella*. São considerados Gram-negativos, em forma de bacilos, anaeróbios facultativos, não esporulados, podendo ser imóveis ou móveis no caso de possuírem flagelos peritríquios. Enterobacteriaceae são catalase positivos, oxidase negativos, fermentam a glicose e são capazes de reduzir nitrato a nitrito. Estes microrganismos podem ser encontrados amplamente na Natureza na água, vegetação, solo e no microbioma intestinal do ser humano e dos animais. Enterobacteriaceae é responsável pela maioria das infeções intestinais, e relacionado com infeções urinárias e septicemia. A diferenciação dos diferentes géneros e espécies da família Enterobacteriaceae realiza-se através de sequenciação genética, método automatizado, procedimento bioquímico, coloração de Gram, verificação fermentação de glucose e o teste da oxidase [16]. Também se podem diferenciar através dos fatores de virulência como os flagelos que são o antígeno H, as cápsulas que são o antígeno K (responsáveis por septicemia) e a camada LPS que contém o antígeno O [55].

A bactéria *Escherichia coli*, pertencente à família Enterobacteriaceae, é Gram-negativa, em forma de bastonete, podendo ser imóvel ou móvel na presença de flagelo. Estas bactérias podem-se encontrar distribuídas no solo, vegetais, água e trato intestinal de animais e seres humanos. Podem ser divididas em patogénicos, patogénicos oportunistas e não-patogénicos [56]. *E. coli* é caracterizada como uma bactéria anaeróbia facultativa, crescendo em ambientes com temperatura entre 7 e 46 °C, e temperatura ótima entre 35 e 40 °C. A estirpe *E. coli* O157:H7 cresce entre 8 e 45 °C, com temperatura ótima de 37 °C. O limite mínimo de aw para o seu crescimento é de 0.95, e de pH 4.4 a 9.5. Em ambientes com NaCl o crescimento ocorre até uma concentração de 6.5 a 8.0%. A presença de fímbrias e de outras estruturas afetam a ação da bactéria e sua incidência [49].

Consideram-se os principais grupos patogénicos associados ao consumo de alimentos *E. coli* enteroinvasivas (EIEC), *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC), *E. coli* enteropatogénicas (EPEC) e *E. coli* enterotoxigénicas (ETEC), onde se inclui a estirpe *E. coli* O157:H7. As suas estirpes podem ser identificadas pela presença de antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (K) [49]. A transmissão das infeções por *E. coli* ocorre através do contacto com animais, contacto com pessoas infetadas e consumos de alimentos contaminados [56].

A indústria alimentar desde cedo reconheceu o perigo da sua presença, sendo por isso utilizada como indicador de contaminação fecal em água e alimentos [57]. O controlo da contaminação deve passar pela minimização da sua presença na criação de animais, cumprimento das temperaturas no armazenamento da comida, e evitar consumo de água não tratada e de carnes mal cozinhadas. Além disso, a implementação de sistemas de autocontrolo como o caso do HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points*), permite que haja uma maior prevenção ao longo de toda a cadeia de manuseamento do produto [57].

Para a deteção deste microrganismo e suas toxinas podem ser utilizados ensaios sorológicos, nos quais são identificados diferentes antígenos (O, K e H) na superfície bacteriana que são assim diferenciados e identificados. Também se pode optar por técnicas moleculares baseadas na análise de ADN, como PCR (*Polimerase Chain Reaction*) e PCR em tempo real e PCR multiplex. Nestas conseguem-se identificar as toxinas sem ser necessário isolar o microrganismo [58]. Se o objetivo é uma deteção mais rápida pode-se optar por *kits* que se encontram comercialmente disponíveis, mas que apresentam a desvantagem de possuírem um custo elevado.

Salmonella, pertencente à família Enterobacteriaceae, é uma bactéria Gram-negativa, em forma de bacilo, podendo ser imóvel ou móvel na presença de flagelo. Existem cerca de 2300 serotipos que se distinguem pela presença dos antígenos H, O e Vi [49]. Estes microrganismos crescem em ambientes com oxigénio, sendo anaeróbias facultativas e com temperaturas entre 2 e 46 °C, sendo a temperatura ótima de crescimento de 37 °C. A sensibilidade da *Salmonella* ao calor depende das condições de aquecimento às quais o organismo foi sujeito anteriormente e aos constituintes do meio ou alimento onde o organismo é aquecido [59]. Esta bactéria não se multiplica em temperaturas negativas, mas é resistente à congelação. Para que ocorra a sua multiplicação tem de estar num meio com pH entre 3.7 e 9.5, sendo o intervalo ótimo entre 6.5 a 7.5, o pH mínimo pode variar dependendo da presença de ácidos como o acético ou benzoico nos alimentos, que diminuem a atividade microbiana [49]. No caso de um baixo valor de pH, a resistência ao calor diminui [59]. O limite mínimo de aw para o crescimento destes microrganismos é de 0.95. Nas condições de baixa aw a resistência ao calor aumenta [59]. O limite no conteúdo de NaCl é de 4.0%, aumentado a tolerância a este conteúdo com o aumento da temperatura [60]. Este microrganismo pode ser encontrado em vegetais, frutas, pássaros, insetos, anfíbios, répteis,

no homem e inclusive no trato intestinal de mamíferos. Pode infetar alimentos tais como leite e produtos derivados do mesmo, vegetais, ovos, água, carne derivada de aves, suínos e bovinos, pescado e moluscos [49]. A contaminação pode ocorrer devido à elaboração e/ou manipulação incorreta dos alimentos e falta de condições de higiene no tratamento dos alimentos. A contaminação através de manipuladores que se encontram contaminados é pouco usual. A dose necessária para a infeção pode ser de baixa concentração, dependendo sempre da estirpe em causa. Quando contaminados com bactérias viáveis, as pessoas podem sentir dores abdominais, vômitos, náuseas, diarreia e febre durante 2 a 3 dias [49].

Salmonella pode ser eliminada por irradiação e pasteurização. No caso da irradiação a presença de oxigénio aumenta o efeito letal, que atinge o seu máximo no intervalo de temperaturas entre 45 a 55 °C. No entanto, a pasteurização torna-se pouco eficiente quando na presença de um alimento com baixa atividade de água e elevado conteúdo em gordura [60]. O controlo da contaminação passa pela confirmação de não terem ocorrido alterações nas propriedades dos alimentos que previnem a sua contaminação, cumprimento das boas práticas de higiene de modo a evitar a contaminação cruzada e verificação da temperatura de armazenamento dos alimentos para evitar a propagação dos microrganismos [60].

A deteção da *Salmonella* pode ocorrer pelo método convencional ou pelo método molecular. O método convencional utiliza o isolamento, identificação bioquímica e caracterização antigénica e as fases de pré- enriquecimento, enriquecimento seletivo, isolamento em meio sólido, seleção de colónias suspeitas e sorologia. Esta técnica é utilizada para a deteção em alimentos em situações que não propiciem o seu desenvolvimento, microbioma competidor e em que as células estejam danificadas pelas técnicas de preservação dos alimentos [61].

No isolamento em meio sólido os ágares utilizados (ágar Hektoen, ágar Rambach, MacConkey e ágar xilose lisina tergitol 4) são seletivos e diferenciais devido às bactérias se propagarem em meios com diferentes características. Através dos testes bioquímicos consegue-se, no caso de crescimento bacteriano, determinar a mudança da cor dos meios de cultura e a mudança do pH. As amostras são incubadas a 37 °C durante 24 horas para depois se poder realizar a interpretação dos resultados. As colónias que se revelarem compatíveis com *Salmonella sp.* são sujeitas a uma caracterização bioquímica definitiva. De seguida realiza-se caracterização antigénica com a utilização de soro antissomático [62].

A fase de pré-enriquecimento consiste na recuperação de células do microrganismo, que estavam em pequena quantidade no alimento. O enriquecimento inibe a proliferação de microbioma que não se está a analisar e promove as que se está a analisar, mantendo-se no meio 18 a 24 horas. Tem de se ter em atenção que a resistência da *Salmonella* varia de estirpe para estirpe, podendo ser necessários meios diferentes para cada uma. O isolamento em meio sólido visa desenvolver colónias de *Salmonella* com características que as distingam para a confirmação sorológica e bioquímica. A seleção de colónias suspeitas e sorologia pretende confirmar se os isolados são do microrganismo em causa. São necessários quatro dias para se conseguirem indícios de contaminação no cultivo para o isolamento de *Salmonella* [63].

O isolamento dos microrganismos pode ser dificultado pela competição com outros microrganismos, antimicrobianos. Além disso, a obtenção dos resultados por este método demora cerca de quatro dias, e a indústria alimentar necessita de resultados mais rápidos [64]. Deste modo, optam por utilizar métodos mais rápidos como o uso de kits comercializados e que se baseiam na hibridização de ácidos nucleicos, técnicas sorológicas e ensaios imunoenzimáticos, ELISA, que permitem uma deteção eficiente e rápida [65]. O teste ELISA utiliza anticorpos policlonais e monoclonais que permitem detetar uma grande variedade de estirpes de *Salmonella*. Testes como este diminuem o tempo de espera de resultados de quatro para dois dias. Estes possuem diferentes sensibilidades e especificidades na deteção de *Salmonella* para evitar a ocorrência de falsos positivos e falsos negativos [66].

O diagnóstico molecular inclui a sorotipagem, sorologia, caracterização bioquímica e suscetibilidade a antimicrobianos [63]. Este método necessita de um maior espaço de tempo para que se consiga obter a identificação dos microrganismos, mas os seus resultados são fiáveis [67]. Neste diagnóstico da *Salmonella* recorre-se ao PCR por ser mais rápido na obtenção de dados (passa de dias para horas) e por favorecer a deteção de microrganismos que não estão adaptados ao cultivo padrão. Pode ser utilizado para detetar uma região única característica de uma estirpe. Além disso, não é uma técnica predisposta a falsos negativos, visto não depender de alterações fenotípicas e não ser vulnerável a reações atípicas. Por outro lado, a desvantagem desta técnica é no caso da presença de substâncias que possam inviabilizar a amplificação do ADN, como sais biliares e proteinases, a deteção dos agentes microbianos torna-se dificultada [63].

Lactobacillus são microrganismos Gram-positivos, em forma de bastonete, anaeróbios facultativos ou organotróficos microaerófilos. Têm temperatura ótima de crescimento

entre 30° e 40°C [68]. Não são produtores de esporos e são negativos para catalase [69]. Podem ser encontrados na Natureza e são, maioritariamente, inofensivos à saúde do consumidor. Podem ser encontrados no trato intestinal de humanos e animais desempenham funções benéficas ao organismo. Por outro lado, são responsáveis por decompor frutas, vegetais e nutrientes[68]. Estes microrganismos são fermentativos e pertencem às bactérias de ácido láctico, produzindo ácido láctico e energia derivada da fermentação da lactose, glucose e outros açúcares derivados da via homo-fermentativa. Além disso, pela via hétéro-fermentativa há a produção de álcool em adição ao ácido láctico obtido pelo açúcar. Este mecanismo que permite a produção de ácidos leva a que não ocorra o crescimento de outros microrganismos [68].

As técnicas para a identificação de *Lactobacillus* baseiam-se usualmente na diferenciação pelo seu fenótipo tendo em conta um meio seletivo. A identificação do fenótipo pode ser por diferenciação pelas características fisiológicas e características bioquímicas. As características fisiológicas são a temperatura de crescimento, mobilidade, crescimento em cloreto de sódio e tipo de respiração. As características bioquímicas que permitem a diferenciação são produção de isómeros de ácido láctico, tipo de fermentação, presença de enzimas específicas (arginina dihidrolase) e coagulação do leite. Também se podem realizar testes API para a identificação, que são *kits* comerciais que permitem a identificação de bactérias e leveduras Gram-positiva e negativa [70]. No entanto, estes testes, apesar de facultarem resultados rápidos, não são os mais fiáveis a que se pode recorrer [69]. Além destes métodos, pode-se recorrer a uma eletroforese em gel SDS a toda a célula, onde se obtém a impressão digital proteica, ou PCR. No entanto, este tipo de análises baseadas em métodos moleculares possuem um custo elevado [69].

Clostridium é uma bactéria Gram-positiva, em forma de bastonete, anaeróbia estrita e imóvel que possui a capacidade de formar esporos, que sobrevivem a temperaturas extremas [71]. As células vegetativas crescem e os esporos germinam quando a *a_w* tem valores entre 0.93 e 0.97. Quando NaCl tem concentração superior a 6% o seu crescimento é inibido. Este microrganismo cresce em ambientes entre 12 e 50°C e possui temperatura ótima de crescimento entre 43 e 47°C. Consegue-se duplicar em 10 minutos em ambientes que apresentem a sua temperatura ótima. A produção de enterotoxinas ocorre entre 30 e 40°C, e é inativada a 60°C durante 10 minutos. *Clostridium* prolifera em ambientes com pH entre 5.5 e 9.0, com crescimento máximo entre 6.0 e 7.0, e a sua esporulação ocorre entre 6.0 e

8.0. As células vegetativas não sobrevivem em ambiente com pH inferior a 5.0 4 superior a 8.3 [72]. É um microrganismo pertencente à família Bacillaceae, com as espécies *Clostridium perfringens* e *C. botulinum* que são identificadas como um agente importante para doenças de origem alimentar. *Clostridium perfringens* produz toxinas de cinco tipos diferentes: A, B, C, D e E. *Clostridium botulinum* produz as toxinas A, B, E e F [73]. *Clostridium* pode ser encontrado amplamente no ambiente, faz parte da microbiota normal do trato intestinal tanto de animais como de humanos. Os esporos que estes produzem permanecem nos sedimentos, vegetação, solo e em áreas de poluição fecal. Os alimentos de origem animal são aqueles em que é mais comum encontrar esta bactéria, assim como a toxina. Também é encontrado em alimentos crus, cozinhados e desidratados [72].

A maioria das intoxicações é causada quando após a cozedura de alimentos estes não são arrefecidos rapidamente. Sempre que os alimentos apresentam dimensões que não permitem que seja todo aquecido, na sua totalidade, as condições de anaerobiose e o arrefecimento lento permitem a germinação de esporos e posterior crescimento bacteriano. As células viáveis de *C. perfringens* são destruídas a 60 °C, mas os esporos sobrevivem [74]. Para prevenir a contaminação do alimento e produção de toxina é necessário que seja mantido a 65 °C ou arrefecido rapidamente a 10 °C. Quando se trata de alimento aquecidos, devem ser sujeitos superiores a 75 °C para destruir as células vegetativas [72]. Além disso devem ser seguidos os fundamentos da higiene e boas práticas da manipulação dos alimentos, visto ser um microrganismo disperso por toda a Natureza [71]. A resistência que *Clostridium* possui à radiação depende da estirpe que se está a eliminar, variando de 1.2 a 3.4 kGy. A maioria das intoxicações surge com a enterotoxina A produzida por *C. perfringens* [74]. A dose necessária para causar intoxicação é de 1000000 células vegetativas por grama de alimento. Os sintomas que são apresentados são febre, vômitos, diarreia e dores abdominais agudas. Este tipo de intoxicação não costuma ser considerada do tipo muito grave, não lhe sendo apontada um número elevado de mortes. As intoxicações causadas pela enterotoxina produzida por *C. perfringens* do tipo C são mais raras, mas mais graves, podendo causar inflamação necrótica do intestino delgado [73].

Para se detetar *Clostridium* pode-se optar por métodos que utilizam anticorpos monoclonais ou policlonais como a difusão em gel simples ou duplo, eletro-imunodifusão e ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*). Estes permitem a deteção de enterotoxinas produzidas por este microrganismo mesmo em quantidades reduzidas, sendo considerados

mais sensíveis. Para a detecção de genes de enterotoxina (*cpe*), que se encontra no plasmídeo ou cromossoma, é utilizado o qPCR ou PCR multiplex [75].

Streptococcus é Gram-positiva, pertencente à família Streptococcaceae, apresenta-se na forma de cocos, apresenta-se em pares ou cadeias [76]. Além disso, é catalase negativa, não apresenta mobilidade nem é formadora de esporos. São microrganismos anaeróbios facultativos ou aerotolerantes. Algumas espécies têm ainda a capacidade de formar cápsula como é o caso de *S. pyogenes*. Possui a capacidade de formar ácido láctico através da fermentação de açúcar [75]. Estes microrganismos têm a capacidade de crescer em ambientes com temperatura entre 20 e 42 °C, tendo temperatura ótima de 37 °C. Podem ser encontrados em ambientes com pH entre 4.8 e 9.3, com valor ótimo de 7.0. Não se desenvolvem se estiverem na presença de NaCl a 6.5% [75], [76]. Podem ser encontrados na Natureza em animais e em humanos. As espécies patogénicas são mais incidentes na pele e mucosas do trato respiratório, digestivo e genital [77]. *Streptococcus* podem ser encontrados em alimentos como leite cru, saladas, gelados e marisco. A sua contaminação ocorre principalmente se decorrerem muitas horas entre o período de serem preparados e serem consumidos [76]. Como sintomas podem ser descritos os mesmos das doenças que causa. Estas são faringite, febre reumática e impetigo. Estes microrganismos atacam as células sanguíneas com a atividade α -hemólise ou β -hemólise [78]. As espécies patogénicas são inibidas durante o processo de pasteurização e a temperaturas inferiores às a que são sujeitas durante o mesmo. As espécies intestinais conseguem resistir a este método de eliminação [77]. Com um diagnóstico correto e tratamento com recurso a antibióticos, a taxa de mortalidade dos afetados é baixa [76].

O controlo deste tipo de contaminação passa por os alimentos serem manipulados com as condições de higiene necessárias, tratamentos térmicos e ao arrefecimento rápido a temperaturas que possam ser inferiores a 7 °C [78]. A sua identificação pode partir do padrão hemolítico que surge com o ágar de sangue, reações bioquímicas e características antigénicas da parede celular [78].

Pseudomonas é uma bactéria Gram-negativa, pertencente à família Pseudomonadaceae, em forma de bastão, móvel devido à presença de um flagelo, aeróbia e oxidase positiva e presença de pigmentação [79]. Pode ser encontrada na água, no solo, animais e plantas, onde é patogénica. Caracteriza-se como patogénica nosocomial. Também está presente em biofilmes, devido à sua capacidade de rápido movimento em meio aquoso [80]. Consegu

crescer num ambiente até 42 °C, possuindo temperatura ótima de crescimento de 37°C, sendo resistente a ambientes com teor elevado de sais. Para o seu desenvolvimento não é necessário um meio altamente enriquecido, necessitam apenas de uma fonte de nitrogénio e de carbono. Pode desenvolver-se na ausência de oxigénio se estiver na presença de nitrato, que funciona como aceitador de eletrões [80].

A contaminação por parte de *Pseudomonas* pode causar infeções urinárias, dermatites, infeção do trato respiratório, infeções gastrointestinais, infeções nos ossos e músculos e infeções sistêmicas. A incidências destas infeções aumenta em doentes cancerígenos e que padeçam de SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida). *Pseudomonas aeruginosa* tem uma taxa de mortalidade superior a 50%, infetando pacientes hospitalizados com cancro, queimaduras e fibrose cística. A aplicação de uma vacina em pacientes de alto risco permite uma maior proteção [80].

A deteção da sua contaminação pode ser efetuada por produção de pigmentos, diferenciação da morfologia da colónia testes bioquímicos, *kits* comerciais, técnicas fenotípicas e genotípicas. Os pigmentos produzidos como o caso do verde na síntese da piocinina azul e fluoresceína a amarelo, permitem a identificação das colónias no início da sua formação. A diferenciação da morfologia da colónia ocorre no seu tamanho e formato. Os testes bioquímicos baseiam-se no metabolismo de diversos substratos: citrato positivo, lisina negativo e indol negativo, oxidase positivo e fermentação açúcar negativa, permitindo distinguir entre as diversas espécies de *Pseudomonas*. O uso de *kits* comerciais permite uma rápida deteção, no entanto pode não distinguir as diferentes espécies e ser mais dispendioso [79]. A técnica fenotípica a que se recorre é a sorotipagem, mas não é suficientemente discriminatória entre as diferentes estirpes. As técnicas genotípicas que são utilizadas são a Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE), hibridização com sondas específicas, Reação em Cadeias de Polimerase (PCR) ou a realização análises polimórficas do ADN (RAPD), que realiza PCR com baixas condições de especificidade, simples e rápido [73].

De modo a se controlar a contaminação por parte de *Pseudomonas* devem-se seguir-se as regras de higiene, existir um controlo contínuo da qualidade da água, utilizar materiais esterilizados e reduzir-se o uso de antibióticos para que a resistência aos mesmos não aumente [80].

2.2.7. Leveduras

As leveduras são fungos que se apresentam sob a forma unicelular. Têm a capacidade de se reproduzirem e crescerem mais rapidamente que os bolores e provocarem alterações químicas mais eficazes nos alimentos [22].

Estes microrganismos podem ser utilizados na indústria alimentícia como no caso da cerveja e pão. No entanto, a sua existência pode ser prejudicial em determinados alimentos impedindo a sua comercialização [29].

2.2.8. Bolores

Os bolores são fungos pluricelulares que podem ser visíveis a olho nu. Alguns bolores produzem toxinas, tornando-se perigosos para o ser humano [16].

A sua dispersão nos alimentos é favorecida por serem tolerantes a ambientes extremos como baixo pH, temperatura e aw. Deste modo, os alimentos são mais suscetíveis a serem alterados nas suas características nutricionais e organoléticas e a serem contaminados com micotoxinas [22].

O controlo para evitar contaminação por parte destes organismos passa por verificar a qualidade dos produtos desde a matéria-prima, controlo das condições em que o produto é manipulado e processado, cuidados após o processamento térmico e verificação das condições de embalagem, a vácuo ou atmosfera modificada [22].

2.3. A planta *Oryza sativa*

A planta *Oryza sativa* é uma monocotiledónea anual, que se desenvolve tanto em solos alagados como em solos não alagados. É constituída por raízes, caule, folhas e panículo, como se pode observar na FIG. 5 [81] .

A raiz seminal é seguida por raízes secundárias, com raízes laterais, que resistem até pouco tempo após a germinação. São depois substituídas por raízes adventícias, produzidas dos nós dos caules jovens. São caracterizadas por serem fibrosas e possuírem pêlos radiculares e ramificações [82].

O caule é constituído por colmos, um principal e vários primários e secundários [82].

As folhas diferem em primária e secundárias. A primária é cilíndrica e não apresenta lâmina. As secundárias estão dispostas de forma alternada no colmo e surgem de gemas. Consoante o ciclo, surgem 8 a 14 folhas no colmo. A última folha a surgir é denominada folha bandeira [82].

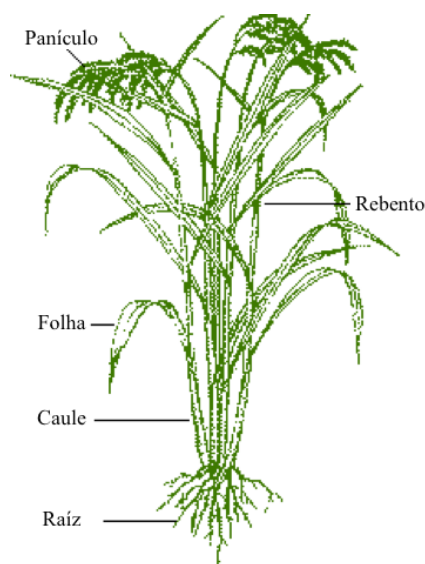


FIG. 5 Planta *Oryza sativa*. Adaptado de [183].

A panícula corresponde à inflorescência da planta e está localizada na folha bandeira. É constituída pela ráquis de onde surgem as ramificações primárias. Destas surgem as ramificações secundárias que dão origem às espiguetas. As espiguetas são formadas por dois pares de glumas. O par inferior é estéril e o superior contém a pálea e lema, que por sua vez têm a flor. A lema pode ter uma extensão denominada arista, que é formada pelo ovário fecundado e contém uma semente nas paredes. A lema, pálea e glumas estéreis formam a casca [82].

2.4. Germinação

O processo de germinação é influenciado pela água, oxigénio, temperatura e radiação solar. Sete a oito dias após a germinação inicia-se a fotossíntese e absorção de minerais. O oxigénio, carbono e hidrogénio constituem cerca de 95% do peso médio da massa verde das plantas [83].

Os campos de plantação de arroz são abundantes em cianobactérias. As cianobactérias são procariotas fotossintéticos, encontrados em habitats terrestres e marinhos. Possuem como característica serem microrganismos que têm a capacidade de fixar o nitrogénio livre [84]. A presença destas aumenta a fertilidade do solo, devido à maior fixação de nitrogénio. Deste modo, há uma relação de simbiose entre *Oryza sativa* e as cianobactérias [85].

Oryza sativa demora cerca de três meses a completar o ciclo da germinação e amadurecimento, podendo variar tendo em conta as condições de germinação [86]. As sementes germinam entre 5 a 7 dias, e, no caso de ambiente controlado, 4 a 6 dias. O índice de germinação costuma ter o valor de 80%. Na presença de valores abaixo dos 60% as sementes não se encontram em condições para se plantar [86].

A germinação da semente corresponde ao desenvolvimento do embrião em radícula e coleóptilo. Este processo pode ser dividido na embebição, ativação e fases de crescimento pós-germinação. A semente após a absorção encontra-se saturada de água e a sua humidade aumenta de 25 a 35% [86]. É depois de embebição que se observa o surgimento do coleóptilo e a formação da primeira folha, denominado germinação. Na FIG. 6 podem-se observar as diferentes fases de germinação, fase vegetativa e reprodutiva [87].

A germinação do arroz pode ocorrer em condições anaeróbias com um crescimento anormal de alguns constituintes como coleóptilo, folha e raízes. A intensidade da luz também afeta o processo [86].

Após a maturação a semente apresenta um período de dormência que se pode dever a um caso de impermeabilidade da casca da semente, embrião imaturo, restrição do embrião ou inibição da germinação [88].

Durante o processo de germinação a α -amilase tem um papel importante. O amido que se encontra no endosperma é gradualmente hidrolisado por esta enzima, de modo a fornecer energia para a germinação. Este é depois transformado em açúcares

metabolizados que proporcionam a energia necessária para o crescimento das raízes e caules [89].

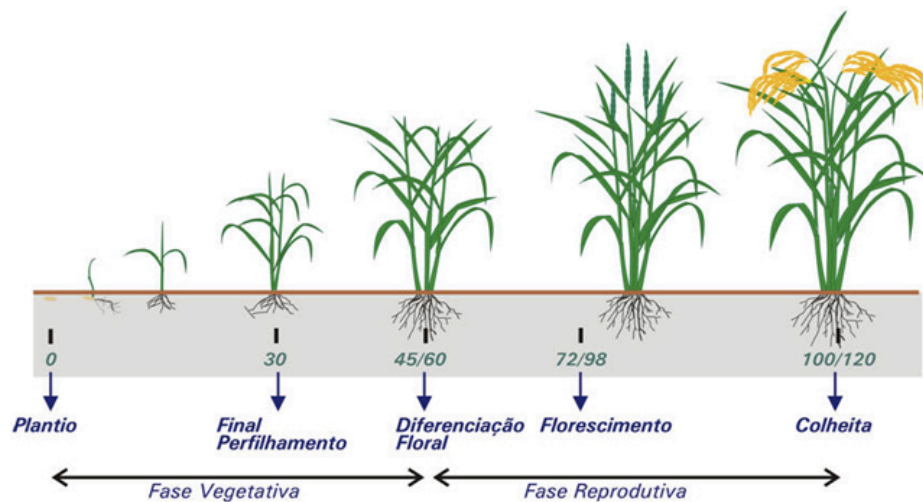


FIG. 6 Fases de germinação de *Oryza sativa* [87].

A α -amilase é produzida na camada do epitélio e expressa na camada de aleurona devido à giberelina ativa [90]. Após a sua expressão é secretada para o endosperma de modo a hidrolisar o amido [89].

2.5. Variedades de grãos de arroz

Existem diversos tipos de grãos de arroz, que incluem Agulha, Carolino, Basmati, Integral, Vaporizado e Selvagem, que se podem observar na FIG. 7.

O arroz do tipo Agulha é mais fino, pertencendo à subespécie *indica*, e distingue-se pela capacidade de ficar mais solto após cozedura [24].

O arroz do tipo Carolino pertence à subespécie *japonica*, sendo um grão mais grosso e pequeno [24].

O arroz Integral encontra-se tanto em grãos curtos ou longos. É rico em fibras, sais minerais e vitaminas [24].

O arroz do tipo Selvagem possui poucas calorias e é rico em nutrientes. É mais usualmente encontrado em misturas com o arroz branco, devido ao seu sabor intenso [24].

O arroz Basmati provém da Índia, e distingue-se pelos grãos longos, finos e aromáticos [24].

O arroz Vaporizado é rico em fibras e minerais. É tratado com vapor de água, no qual os nutrientes do pericarpo passam para o grão. Apresenta-se dourado e firme [24].



FIG. 7 Diferenciação dos diversos grãos de arroz [24].

2.6. Estado físico do arroz

O arroz encontra-se em vários estados físicos tendo em conta a fase em que se encontra.

O arroz é denominado em casca (*paddy*) quando ainda está envolto em casca [10]. Após ser removida a casca é denominado descascado ou em película [10].

Quando se procede à remoção da casca, parte do gérmen, e das camadas externas do pericarpo está-se presente arroz semibranqueado [10].

O arroz em casca, ao qual é eliminado a casca, a totalidade das camadas do pericarpo e gérmen, mas em que ainda se encontram presentes algumas estrias brancas longitudinais, cerca de 10%, é designado arroz branqueado [10].

2.7. Tratamento ao qual o arroz é sujeito

O arroz é sujeito a uma possível gama de tratamentos antes de ser comercializado. Após estes tratamentos surge o arroz estufado ou vaporizado (*parboiled*), pré-cozido, glaciado e matizado [10].

O arroz vaporizado é arroz que se encontrava em casca ou película e que após imersão em água, vaporização e secagem é sujeito a processamento para poder ser consumido. Neste tipo de arroz o amido está totalmente gelatinizado. O arroz que sofre um tratamento físico de modo a reduzir o tempo de cozedura é o denominado pré-cozido. Quando se envolve arroz branqueado numa película de glucose e talco obtém-se arroz glaciado. O arroz branqueado que se encontra envolvido por uma camada de óleo comestível é designado arroz matizado [10].

2.8. Características do grão de arroz

O grão de arroz pode ser caracterizado pelo seu comprimento, largura, cor e estado físico. Foi considerado pela Comissão de *Codex Alimentarius* a divisão dos grãos de arroz tendo em conta a razão Comprimento-Largura. Foi decidido que os grãos curtos têm razão inferior a 2.0, os médios de 2.1 a 3.0 e os longos superior a 3.1 [91].

Os grãos de arroz podem ser divididos em inteiros, despontados, partidos/ trinca, verdes, vermelhos, estriado de vermelho, deformados, danificados, gessados, fendidos, manchados, amarelos, ambarinos, escuros, casca, farelo de casca, sêmea, farinha e impurezas [10].

A casca é constituída pelas glumas e glumelas que revestem a cariopse. Por sua vez, o farelo da casca é o produto que se obtém da trituração da casca. O gérmen corresponde ao embrião da semente do arroz. A sêmea resulta dos resíduos das camadas do pericarpo que são removidas após se proceder ao branqueio. A farinha corresponde ao produto da trituração de grãos inteiros ou trinca branqueada [10].

Os grãos inteiros são grãos que podem não possuir a ponta do grão. Os grãos despontados não possuem a parte apical ou ponta, após serem sujeitos a branqueio. Os grãos partidos/ trinca têm comprimento inferior ou igual ao que normalmente seria três quartos de um grão

médio inteiro. Os deformados têm apresentação morfológica diferente do grão da variedade, enquanto que o grão danificado apresenta sinais de deterioração. Os grãos que se encontram partidos longitudinalmente são denominados fendidos [10].

Os grãos verdes são grãos que não possuíram maturação completa. Os vermelhos têm parte da superfície com pericarpo vermelho. Por sua vez os estriados vermelhos apresentam estrias longitudinais com pericarpo vermelho. Os grãos amarelos são amarelo-alaranjados devido à deterioração. Os ambarinos têm cor âmbar por causa de uma mudança na sua cor natural. Os grãos escuros apresentam mais de um quarto da sua superfície com cor escura. Os gessados têm a superfície opaca. Os grãos manchados apresentam manchas em tons escuros, ou estrias negras [10].

As impurezas são atribuídas a todas as substâncias que não fazem parte do arroz [10].

2.9. Estrutura e composição do grão

O grão de arroz, *paddy*, é constituído por várias camadas, como se pode observar na FIG. 8, que diferem no seu conteúdo.

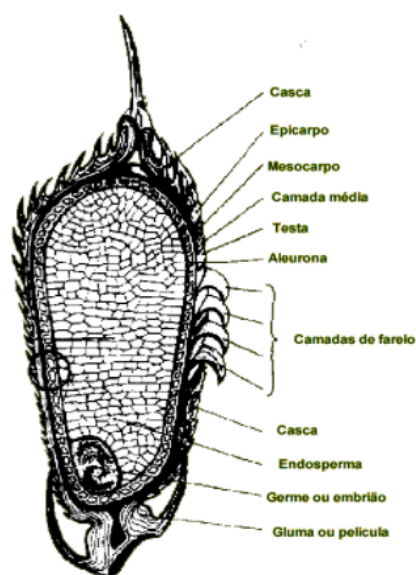


FIG. 8 Ilustração de um grão de arroz. Adaptado de: [92].

O grão de arroz é constituído pela casca e cariopse. A casca funciona como camada

protetora, e pesa cerca de 20% do peso do grão. O grão por descascar é composto pelas camadas da cariopse, embrião e endosperma [7].

A casca é a cobertura da cariopse, sendo 18 a 20% do peso em matéria seca do arroz [93]. Esta cobertura tem como função proteger contra agentes exteriores e mudanças no valor de humidade do grão, que pode levar à sua degradação. A sua constituição é reduzida em proteínas, hidratos, amido, cálcio, sódio, magnésio, potássio, alumínio, ferro e zinco. No entanto, é rica em fibras, cinza [93]. Assim, a sua constituição não a torna significativa a nível nutricional, não sendo consumida pelo ser humano [93].

A cariopse é constituída pelo pericarpo, tegumento e aleurona. O pericarpo fornece a pigmentação ao grão [7]. A aleurona possui 5 a 6 camadas e é mais densa no lado dorsal, em relação ao lado ventral. Além disso, também é mais densa nos grãos mais curtos do que nos mais longos [94]. Apresenta corpos proteicos e corpos lipídicos. A aleurona rodeia o endosperma, e também inclui o embrião. Este encontra-se no lado ventral da base, é rico em corpos proteicos e lipídicos e corresponde a cerca de 2-3% do arroz integral [9].

O endosperma consiste na maioria do grão (89-94% do arroz integral) e é formado por corpos proteicos e células ricas em grânulos de amido [9]. As células do endosperma têm uma parede fina e incluem amiloplastos com grãos de amido. As duas camadas mais exteriores são ricas em proteínas e lípidos e possuem amiloplastos e grânulos de amido mais pequenos que o interior do endosperma (FIG.9).

Pela separação da casca e da cariopse, no qual se descasca o arroz, obtém-se o arroz integral [11]. Para se obter o arroz branco, o arroz integral é polido. Neste processo são removidas as camadas do farelo (pericarpo, tegumento, camada de aleurona e embrião) [11].

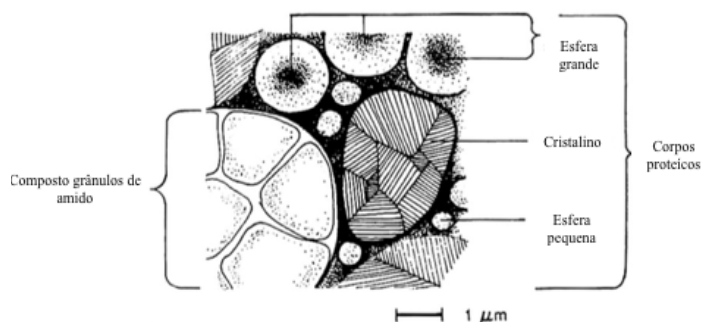


FIG. 9 Representação dos grânulos de amido e corpos proteicos no grão de arroz na camada de subaleurona do endosperma. Adaptado de [7].

2.10. Composição

O arroz é constituído maioritariamente por amido, e em quantidades menores por lípidos, proteínas, cinzas e fibras (Tabela 1) [11].

Tabela 1 Composição, em percentagem na matéria seca, do arroz integral e branco polido [11].

Constituinte	Arroz Integral (%)	Arroz Branco Polido (%)
Amido total	74,12	87,58
Proteínas	10,46	8,94
Lípidos	2,52	0,36
Cinzas	1,15	0,30
Fibra total	11,76	2,87
Fibra insolúvel	8,93	1,05
Fibra solúvel	2,82	1,82

A mudança na constituição do arroz integral para o branco polido deve-se ao facto de os nutrientes não estarem uniformemente distribuídos no grão. O interior do grão possui valores mais elevados de amido. Por outro lado, no exterior existe uma maior concentração de proteínas, lípidos, fibras, vitaminas e minerais [11]. Devido a isto, após o polimento do arroz há uma redução elevada dos constituintes exceto no amido.

2.10.1. Amido

O amido constitui cerca de 90% da matéria seca do arroz polido. É um homopolissacarídeo composto e pode ser dividido em dois tipos de polímeros de glucano: cadeias de amilose (FIG. 10 A) e amilopectina (FIG. 10 B). A proporção destas cadeias depende dos génotipos. Os grãos podem ser classificados tendo em conta o conteúdo de

amilose como ceroso (1-2% de amilose), conteúdo de amilose muito baixo (2-12%), baixo (12-20%), intermédio (20-25%) e alto (25-33%) [7].

O amido pode-se dividir em total, que é digerível, sendo constituído pela amilose e amilopectina, e resistente, que é não digerível [95].

O amido total corresponde à totalidade de amido presente no grão de arroz [95].

O amido resistente é considerado o teor de amido que resiste à dispersão em água a ferver, e hidrólise pela amílase pululanase e pancreática. Esta porção é maioritariamente constituída pela amilose retrogradada, que é resistente à digestão [96].

Apresenta como características diluir compostos potencialmente tóxicos e cancerígenos, produzir ácidos gordos de cadeia curta, e reduzir os níveis de insulina, glicose, lipoproteínas de baixa densidade e triglicéridos [97].

A α -amilase promove a fragmentação da molécula de amido por hidrólise das ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 4), produzindo maltose, maltotriose e maltotetrose. Tendo em conta que α -amilase não hidrolisa as ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 6) na amilopectina, a amiloglicosidade é usada para se obter o amido resistente [98].

A capacidade que o amido resistente tem para diminuir as complicações derivadas da diabetes pode estar relacionado com a proteção das funcionalidade dos rins [99].

A amilose é uma cadeia maior de glucose formado por unidades de α -D-glicopirranose ligadas em α - (1,4), com poucas ligações α - (1,6) (FIG.11 A) [100]. Apresenta peso molecular de 10^{5-6} , inferior em comparação à amilopectina, e 500-5000 unidades de resíduos de glucose [101]. Possui limite de β -amilose entre 73% e 95%. Este limite está relacionado com a quantidade e localização das ramificações, tal como ao comprimento da cadeia [100]. Esta pode estar sob a forma de complexos amilose-lípidos (LAM) ou complexos amilose livre (FAM) [102]. Os grãos de arroz apresentam conteúdos de amilose que variam de 35% a 40% [100]. Está localizada entre as cadeias de amilopectina entre regiões amorfas e cristalinas, pode assim influenciar a organização das duplas hélices, interferindo na densidade de empacotamento das cadeias de amilopectina [101]. No entanto a localização exata da amilose dentro do grão ainda não está compreendida [100]. Grãos com maior teor de amilose têm como característica apresentar textura mais firme após cozedura [100].

Alimentos com elevado conteúdo em amilose estão associados a menores níveis de glucose no sangue. Por outro lado, naqueles com níveis reduzidos de conteúdo de amilose ocorre o oposto [103].

A amilopectina é o componente ramificado do amido (FIG.10 B) [100]. Esta é formada por cadeias de α -D-glicopirranose (17 a 25 unidades) ligadas em α - (1,4), com 4% a 6% das ligações em α - (1,6) (FIG.4B) [100]. Possui um peso molecular entre $50\text{-}500 \times 10^6$ Daltons [100]. Apresenta um DP de 4700 a 12800 unidades de resíduos de glicose e β -amilose de 55% a 60% [100], [102]. As cadeias individuais podem variar entre 10 a 100 unidades de glicose [100], [102]. A fração atribuída à amilopectina é responsável pela cristalinidade [7].

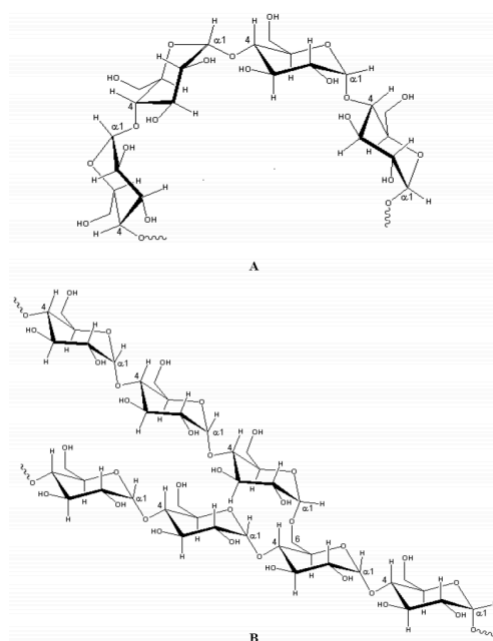


FIG. 10 A) Estrutura da amilose, B) Estrutura da amilopectina. Adaptado [100].

A amilopectina, em comparação com a amilose, é mais importante a nível estrutural e funcional. Isto acontece devido a ser capaz de formar o grânulo, sem necessitar da amilose [100]. Grãos com maior teor de amilose têm como característica apresentar textura mais firme após cozedura [100].

A variedade *japonica* possui uma constituição superior de amilopectina, tendo, por isso, uma maior capacidade de absorção de água. Devido à elevada composição em amilopectina é facilmente sujeito a retrogradação [104].

A variedade *indica* possui amido constituído essencialmente por amilose, o que diminui a sua capacidade de absorção de água. A sua composição é reduzida em amilopectina, não sendo facilmente sujeito a retrogradação [104].

O amido é importante para a microbiota intestinal. A sua presença no intestino leva à presença de bactérias que favorecem o transporte de probióticos que ajudam à resposta

imunitária e diminui o potencial patogénico, como, por exemplo, de proliferação de Enterobacteriaceae [105]. Probióticos são microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, fornecem benefícios para a saúde do hospedeiro [106].

O amido influencia a microbiota intestinal ao fornecer substratos. A maioria das bactérias formadoras de colónias que podem fermentar amido são *Eubacterium*, *Bacterioides*, *Bifidobacterium* e *Escherichia*. A fermentação de amido favorece a produção de butirato, como se pode observar na FIG. 11, que inibe a proliferação de microrganismos patogénicos como *Escherichia*. Deste modo, uma alimentação rica em amido resistente aumenta a presença de bactérias produtoras de butirato, favorecendo o hospedeiro [107].

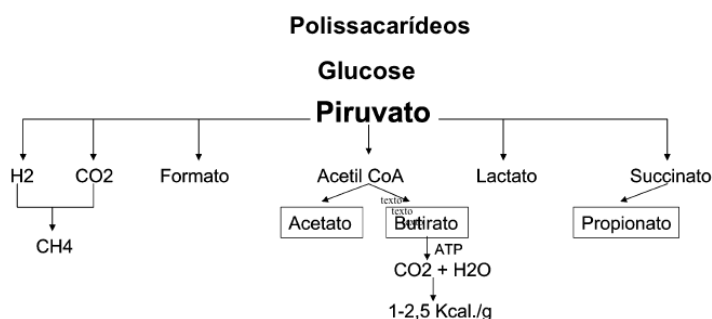


FIG. 11 Fermentação de polissacarídeos com a obtenção de butirato, por bactérias [108].

Prebióticos são ingredientes alimentares não digeríveis que afetam de uma forma positiva o hospedeiro, ao estimular o crescimento de um número limitado de bactérias que levam a melhorias na saúde do mesmo [109]. O amido é um dos prebióticos conhecidos que favorece a entrega de probióticos, através dos produtos obtidos da sua fermentação por *Bifidobacterium* como o butirato [107].

A presença de substratos que impedem a proliferação de microrganismos patogénicos, leva a que haja uma diminuição de coliformes numa dieta rica em amido [107].

2.10.2. Lípidos

Os lípidos são associados a grânulos de amido ou organizados em corpos lipídicos no endosperma, embrião e camada de aleurona. É no gérmen e na camada de aleurona que se

se encontra 1/3 do conteúdo total de lipídios do grão de arroz. No arroz branco a concentração de lipídios é inferior à concentração no arroz integral, concentração de cerca de 1%, devido ao processo de polimento a que é sujeito [97].

2.10.3. Proteínas

O arroz possui apenas cerca de 7% de proteínas na sua constituição. As proteínas podem ser classificadas em globulina (12%), prolamina (3%), albumina (5%) e glutelina (80%) [110].

As proteínas podem ser divididas no endosperma em corpos proteicos I e II [7]. Os corpos proteicos I são estruturas esféricas, com anéis concêntricos, com elevada concentração de prolamina. Por outro lado, os corpos proteicos II não possuem anéis e são ricos em globulina e glutelina [7].

O endosperma tem na sua constituição principalmente glutelina, e o farelo tem albumina. Verifica-se assim uma diferenciação na constituição proteica do farelo e do endosperma [7].

2.10.4. Aminoácidos

O conteúdo em aminoácidos determina a qualidade da proteína. O arroz tem como aminoácido que limita o seu aproveitamento biológico das proteínas a lisina. Este aminoácido apresenta uma das suas maiores concentrações no arroz, resultando num balanço de aminoácidos mais completo [7].

Entre o arroz integral e o arroz branqueado existem diferenças na composição de aminoácidos, que podem ser observadas na Tabela 2 [2]. Estes cálculos foram baseados em 5.8 g de lisina por 16 g de N como sendo 100% [2].

Os aminoácidos livres presentes estão localizados essencialmente no gérmen (594.9 mg), farelo (361.4 mg) e ainda no endosperma (52.7 mg). Entre estes aminoácidos predominam o glutamato e o aspartato [7].

Tabela 2 Conteúdo em aminoácidos em arroz integral e branqueado [2].

Aminoácido	Arroz integral (%)	Arroz branqueado (%)
Histidina	2.3- 2.5	2.2- 2.6
Isoleucina	3.4- 4.4	3.5- 4.6
Leucina	7.9- 8.5	8.0- 8.2
Lisina	3.7- 4.1	3.2- 4.0
Metionina+Cisteína	4.4- 4.6	4.3- 5.0
Fenilalanina+Tirosina	8.6- 9.3	9.3- 10.4
Treonina	3.6- 3.7	3.5- 3.7
Triptofano	1.2- 1.4	1.2- 1.7
Valina	4.8- 6.3	4.7- 6.5
Totalidade de aminoácidos (%)	64- 71	55- 69

2.10.5. Hidratos de Carbono

Os hidratos de carbono são uma fonte importante de energia para os organismos, e são encontrados em alimentos com amido e/ou açúcar. Alguns destes alimentos são a fruta, legumes e cereais [99].

Estes são decompostos em açúcar pelo sistema digestivo, e quando este entra no sangue ocorre a produção da hormona insulina [99].

As pessoas com diabetes têm incapacidade de produção ou absorção de insulina. Sendo assim, os hidratos de carbono devem ser ingeridos de um modo regrado [99].

O farelo e o gérmen possuem essencialmente fibra, contendo uma pequena concentração de hidratos de carbono [7].

2.10.6. Minerais

O conteúdo em minerais nos grãos de arroz é influenciado pelas condições de cultivo como condições do solo e tipo de fertilização. No arroz em casca o silício é o elemento com maior incidência. No arroz integral e branqueado os minerais que fazem maioritariamente parte da sua constituição são o fósforo, potássio, magnésio e silício. O ferro e o zinco estão presentes mais numa concentração reduzida [9].

Os minerais encontram-se em maior concentração na camada exterior do grão, ou seja, há uma maior concentração no arroz integral. Existe uma tendência para a diminuição da concentração dos minerais quanto mais próximo se está do endosperma. Existem menos minerais no endosperma, do que no gérmen e do que no farelo [111].

2.10.7. Vitaminas

As vitaminas são encontradas nos grãos de arroz no endosperma e no farelo. O arroz integral possui uma maior quantidade de vitaminas, devido a não ter sido polido [111].

O arroz é constituído essencialmente por vitaminas solúveis em água. Algumas destas vitaminas são riboflavina (B2), ácido nicotínico, cianocobalamina e inositol (B12), tiamina (B1), piridoxina (B6) e alfa-tocoferol (E). Não contem quantidades significativas de vitaminas hidrofóbicas como a vitamina A e D [111].

2.11. *Germinated Brown Rice*

O *Germinated Brown Rice* tem a capacidade de conservar os nutrientes presentes nos grãos, sendo possível tirar partido de todas as vitaminas e minerais quando consumido. Estes nutrientes são estabilizados no grão antes da sua fissura [112]. Para a obtenção deste são utilizadas as substâncias fisiológicas ativas do farelo, e o processo de imersão que se realiza

contribui para melhorar a textura do arroz integral [113]. Assim, os nutrientes da semente tornam-se mais fáceis de digerir e absorver durante a germinação [114]. Esta imersão realiza-se com a água a temperatura controlada de modo a ser possível promover a germinação [115].

No *Germinated Brown Rice* é apenas retirada a casca permanecendo o endosperma, gérmen e farelo. Deste modo, o arroz mantém todo o seu valor nutricional. Aquando da transformação do arroz integral em branco há uma perda de uma quantidade substancial de vitaminas B1, B3 e B6, manganésio, fósforo, ferro, fibras e lípidos. Neste produto não se verifica tal perda de compostos [116].

Durante este processo a sacarificação amolece o endosperma e as enzimas hibernadas são ativadas. Estas enzimas decompõem os polímeros com elevado peso molecular em substâncias que resultam num aumento do conteúdo de ácido gama aminobutírico (GABA), aminoácidos livres, fibras, ácido fítico, magnésio, potássio, ácido ferúlico, zinco e γ -orizanol [117].

GBR (*Germinated Brown Rice*) apresenta um elevado conteúdo de fibras e nutrientes. Devido a isto possui um reduzido índice glicémico. Os hidratos de carbono são decompostos lentamente, sendo libertado um baixo nível de glucose para a corrente sanguínea [116]. Esta característica apresenta vantagens como promover a perda de peso e equilibrar o nível de açúcar no sangue, sendo uma opção viável para pessoas com problemas de peso e diabetes [113].

Tendo em conta que não são adicionados nutrientes na germinação, as sementes apenas absorvem água e oxigénio. As mudanças que ocorrem resultam de uma decomposição dos compostos em formas mais simples e desaparecimento dos constituintes que não eram considerados necessários [118].

Após a germinação o arroz integral tem os seus compostos químicos alterados. Há um aumento na capacidade de reduzir o conteúdo de açúcar e de cinzas, e uma redução do conteúdo de amilose [119]. As cadeias das moléculas de amido e amilose encontram-se mais curtas e existe uma redução na retrogradação, *pasting temperature* e *vala* [119]. Ocorre uma diminuição gradual no conteúdo de amido total, amilopectina e amilose. A redução no conteúdo de amilose é o processo principal no qual resulta a diminuição de amido [120]. Por outro lado, ocorre um aumento da capacidade de absorção e da turbidez [119].

Durante a germinação as enzimas responsáveis pela hidrólise, como a α -amilase, são ativadas e o amido e proteínas são decompostos levando a um aumento de oligossacarídeos e aminoácidos nos grãos. Estes aminoácidos que estão nos grãos são decompostos pela água absorvida durante a germinação, transformados em amidas transportáveis que são disponibilizados para as partes em crescimento do como as raízes e caule. Como resultado da degradação do amido durante a germinação as propriedades de viscosidade do arroz integral são alteradas [117]. Além disso, durante a absorção de água na imersão a enzima GAD é ativada [115].

Além de um baixo índice glicêmico, existe também um maior conteúdo de GABA (ácido gama aminobutírico). Este componente está associado a relaxamento muscular e mental [112]. GABA acumula durante o processo de imersão em água que ocorre para promover a germinação de GBR [121].

GBR possui dez vezes mais conteúdo em GABA do que o arroz branqueado, e cerca de duas vezes mais do que o arroz integral. Estes níveis conseguem ainda ser superiores no caso dos grãos de arroz serem imersos em água [122].

A presença significativa de antioxidantes como gama-orizanol e proantocianidinas no GBR permitem uma diminuição dos danos provocados pela oxidação [112].

Nos produtos GBR verifica-se um aumento dos açúcares livres com a diminuição do conteúdo em amido. Ocorreu um aumento nas proteínas solúveis e aminoácidos livres, que gerou um aumento na atividade da protéase. Por outro lado, tanto a glucose como a frutose, maltose e maltotriose diminuíram. [123].

Assim, o GBR é um produto com elevado valor nutricional com efeitos positivos na área da saúde, desde ser útil a reduzir a severidade da asma, diminuir a pressão sanguínea, risco de AVC, ataque cardíaco e frequência de enxaquecas [112].

2.12. GABA

GABA (ácido gama aminobutírico) é um aminoácido livre constituído por quatro carbonos. É produzido pela descarboxilação do ácido glutâmico-L, catalisado pela enzima

glutamato carboxilase durante a germinação do arroz em película. Caracteriza-se por ser um neurotransmissor no cérebro e medula espinal dos mamíferos [124], [125].

Este aminoácido encontra-se na Natureza em feijões, folhas de chá, soja, gérmen de arroz, microrganismos como *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Monascus* sp., *Rhizopus* sp., e nos produtos obtidos pelas bactérias produtoras de ácido lático como queijo e iogurte [115]. Estas bactérias são cocos ou bacilos de Gram positivo, anaeróbios aerotolerantes ou microaerófilos, acidófilos. Obtém energia a partir da fermentação de açúcares, da qual o ácido lático é o principal produto final [122].

Existe uma grande variedade de fungos que possui na sua constituição celular GABA. Foi descoberto elevado conteúdo deste aminoácido em fungos filamentosos como *Aspergillus nidulans*, *A. niger*, *Neurospora crassa* [122]. Em alimentos como o arroz foi provado que fungos como *Monascus purpureus* produzem GABA, e na soja fermentada fungos como *Rhizopus microspores* [126]. Algumas estirpes fúngicas associadas a ambientes marinhos demonstraram a capacidade de produzir GABA. Algumas destas estirpes são *Candida*, *Pichia*, *Pseudomona* e *Saccharomyces* [122].

Sabe-se que o GABA possui um papel importante no sistema nervoso central como neurotransmissor, no cérebro humano ao diminuir a pressão sanguínea, e no pâncreas ao ser uma molécula de sinalização no espaço intersticial dos ilhéus pancreáticos [127]. Tem como particularidades baixar a hipertensão, ser diurético, promover a sonolência e ter efeito tranquilizante [121].

Além disso, o GABA, tem efeitos antidiabéticos ao atuar nas células- β e no sistema imunitário, nos quais gera a despolarização das membranas e leva ao influxo de Ca^{2+} [128].

O sistema de sinalização GABA é uma parte integral nos ilhéus pancreáticos humanos, mantendo a homeostasia da glucose. A libertação de GABA entre os ilhéus ativa os canais GABA_A e os recetores GABA_B , que modulam a libertação de insulina [127].

O consumo de alimentos ricos em GABA pode inibir a proliferação de células cancerígenas, ação estimulante na apoptose de células cancerígenas, melhorar a memória e capacidade de aprendizagem [129]. Também permite que ocorra uma regulação das hormonas nos ilhéus, preservação das células- β e controlo da diabetes [128]. Além disso, arroz germinado com elevados níveis de GABA pode levar à inibição da proliferação das células cancerígenas [130].

Durante o processo de germinação de grãos a atividade bioquímica leva à produção de substâncias que são essenciais ao desenvolvimento do embrião. Este processo leva a um aumento no conteúdo de açúcar, péptidos e aminoácidos nas sementes germinadas. Isto verifica-se tanto em arroz, trigo e cevada [125]. De entre as enzimas ativadas, algumas possuem a capacidade de aumentar o conteúdo de vitaminas e GABA [125].

GABA é encontrado em elevada quantidade em alimentos como rebentos de feijão (soja e leguminosas de cor verde ou preta) tratados com dióxido de carbono, e em arroz em película tratado a alta pressão [121]. Os grãos de arroz enriquecidos com GABA são cada vez mais populares no mercado da comida saudável. O seu enriquecimento é influenciado pelo tempo de incubação das sementes, principalmente nos grãos de arroz pré-germinado [124].

O conteúdo de GABA no arroz integral estima-se que oscile entre 0.01 e 0.12 mg [131]. No entanto depende da variedade de arroz e das condições em que este tenha sido cultivado. Estes são fatores importantes para se ter em conta, aquando da obtenção de um GBR com elevado valor nutricional [131].

Nos grãos de arroz em película o GABA encontra-se presente no gérmen. É neste constituinte do grão que se encontra uma elevada concentração de ácido glutâmico que é depois convertido em GABA [132]. O seu conteúdo aumenta no arroz germinado. Este arroz tem mais nutrientes, é melhor digerido e absorvido do que o não germinado. A germinação é afetada por diversos fatores externos como presença/ausência de luz [86], durabilidade do processo [133], pH do meio [134] e presença/ausência de oxigénio [135].

Além disso, também é afetado pelas características do grão como a sua idade, variedade e percentagem de germinação [132]. Para uma acumulação mais rápida os grãos de arroz devem ser sujeitos a diversos tipos de *stress* ambiental como estímulos mecânicos, choques térmicos, anoxia e escuridão [132]. Sabe-se que as condições de pH igual a 5.5 são as mais favoráveis para um aumento no conteúdo de GABA [132].

A germinação desagrega os materiais reservados, sintetiza as proteínas estruturais e componentes celulares das sementes após hidratação. Além disso, também ativa diversas enzimas em sementes cruas, especialmente glutamato descarboxilase (GAD) que catalisa o ácido glutâmico-L em GABA (FIG. 12) [129].

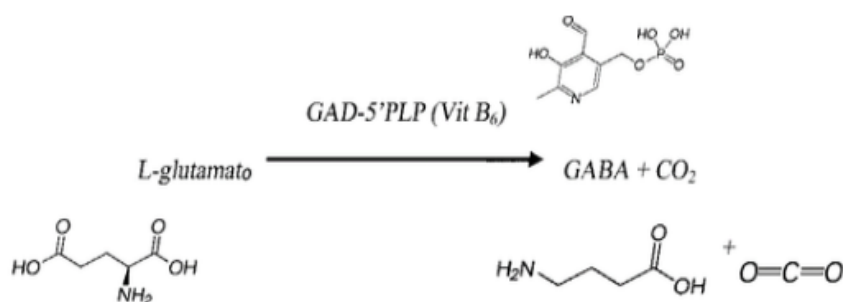


FIG. 12 Reação de descarboxilação de L-glutamato pela enzima GAD que origina GABA [136].

Ao contrário do que acontece nos animais, as plantas têm a capacidade de produzir GABA com o recetor calmodulina a receber Ca^{2+} , que ativa a enzima GAD [137]. Na germinação do arroz integral, em condições onde o ambiente é ácido e quente, esta enzima é ativada na casca e no gérmen [138]. Como a casca contém um elevado conteúdo de GABA pode ser utilizada como uma fonte do mesmo, após ser removida para se obter arroz branco [139].

As condições de germinação são as ideias para a proliferação de microrganismos. A disponibilidade de nutrientes, temperatura ótima, excesso de água, valor de pH e duração do processo são fatores que fazem com que o seu surgimento seja inevitável. Quando os grãos são imersos em água durante um longo período de tempo um odor a fermentação começa a surgir, causado pela ação dos microrganismos [132]. Como solução para esta dispersão pode-se aplicar um agente bactericida, substituir a água repetidamente, ou aplicar ácido láctico. A escolha deste último recai sobre o facto de estar presente em diversas variedades de comida, servir como um conservante de alimentos naturais e ser um regulador de pH em produtos fermentados [132].

2.13. Índice glicémico

O índice glicémico (IG) é uma medida *in vivo* que analisa o impacto dos alimentos com hidratos de carbono na concentração de glicose plasmática [140]. A partir deste índice é indicada a velocidade de absorção e de digestão de cada alimento [141].

Este índice é definido como a área abaixo da curva da resposta glicémica duas horas depois de serem consumidas 50 g de hidratos de carbono. Este valor é dividido pela área abaixo da curva após o consumo de 50 g de hidratos de carbono de uma referência como o pão branco ou a glucose. Quanto maior a área que se apresenta de baixo da curva, maior será o IG [142]. O valor do índice glicémico é dado em percentagem [142].

Deste modo, possibilita a classificação dos alimentos tendo em conta a resposta glicémica e insulínica [143]. Quanto maior a resposta glicémica e insulínica maior será o índice glicémico do alimento [140].

Os alimentos com uma resposta glicémica reduzida são benéficos para os indivíduos sofrem de doenças que os tornam intolerantes à glucose [144].

O índice glicémico varia de 20 a, aproximadamente, 120%. A razão desta grande variância de valores é a taxa de digestão ou absorção de hidratos de carbono, na qual os alimentos com baixo índice glicémico libertam glucose para o sangue numa taxa reduzida [145].

A classificação dos alimentos tendo em conta o índice glicémico divide-se em baixo (inferior ou igual a 55%), médio (59 a 69%) e alto (igual ou superior a 70%) [146].

Para um produto alimentar com baixo índice glicémico não é necessário um conteúdo elevado em fibras, visto que o conteúdo em fibras nos cereais possui um impacto reduzido na glicémia [145].

Existem assim diversos factores que contribuem para uma redução no índice glicémico. O tipo de amido, consequentemente a relação amilose-amilopectina elevada, tal como no arroz vaporizado. O facto de existir um conteúdo elevado em monossacarídeos, no qual o índice glicémico da frutose é inferior ao da glucose. A presença de gordura diminui a velocidade de esvaziamento gástrico. Outro factor é a capacidade que as proteínas possuem de aumentar a secreção de insulina. A existência de inibidores de α -amilase como lecitinas e fitatos diminui o IG. O revestimento por parte das fibras retarda o acesso das enzimas ao amido que se encontra no interior do alimento, diminuindo a velocidade de digestão do amido. O facto de um alimento apresentar elevada acidez diminui a velocidade de digestão do amido, sendo favorável para a diminuição do índice glicémico. Quanto menor a gelatinização do amido, menor a velocidade de digestão do mesmo, e menor é a área disponível às enzimas digestivas. A presença de fibras solúveis aumenta viscosidade e diminui a velocidade, assim como gorduras e as proteínas [147].

Por outro lado, a forma física, como a mudança no tamanho da partícula dos alimentos, e os métodos de processamento que afetam a integridade dos grânulos de amido e facilitam o acesso das enzimas digestivas ao amido interior, afetam o IG [146]. Fatores como ausência de amilopectina, amilose, glicose, hidratos de carbono em partículas pequenas, ausência de gorduras e proteínas e inibidores de amilase fazem com que o índice glicêmico do alimento aumente [147].

Relativamente aos alimentos ricos em amido, um elevado nível de cristalinidade entre os substratos de amido favorece uma menor taxa de conversão de amido em açúcar, e consequentemente, um menor índice glicêmico. Uma estrutura de amido bem ordenada é obtida ao ser reservada a cristalinidade presente nos grânulos, como por exemplo ao ser evitada a gelatinização [145]. De modo a se usar as propriedades de amido libertado a uma taxa reduzida é também necessária uma taxa reduzida de gelatinização [145].

Um produto alimentar como o arroz apresenta valores diversificados de índice glicêmico. Esta diversidade deve-se às diferenças botânicas que o arroz apresenta de país para país [148].

As diferenças no conteúdo da amilose explicam as variâncias no índice glicêmico visto a amilose ser digerida a uma velocidade menor do que amilopectina [148]. As variedades ricas em amilose possuem uma menor resposta ao índice glicêmico. Igualmente, um conteúdo elevado em amido resistente encontra-se relacionado com uma redução do índice glicêmico. A presença de ácidos orgânicos, tal como os que são produzidos durante a fermentação, podem reduzir a glicemia ao reduzir o esvaziamento gástrico, ou ao diminuir a taxa de digestão [145].

Legumes pouco processados e grãos integrais possuem mais hidratos de carbono que são lentamente digeridos. Esta digestão mais lenta é devido à existência de parede celular e outras barreiras celulares que diminuem a velocidade de gelatinização, digestão e absorção. Os alimentos altamente processados têm estas barreiras naturais destruídas possuem uma elevada gelatinização, rápida digestão e absorção, levando a um valor de índice glicêmico superior [147].

Alimentos com baixo IG têm efeito no controlo no nível de glicemia em pacientes com diabetes e na redução da secreção de insulina e diminuir a concentração de lípidos em pacientes com hipertrigliceridemia [149], [150]. Existem diversos tipos de diabetes, sendo os mais comuns Tipo 1, Tipo 2 e Gestacional [151]. A diabetes Tipo 2 é a mais comum e

caracteriza-se pelo desequilíbrio no metabolismo da insulina. Devido ao déficit e resistência à insulina, é necessária mais insulina para a mesma quantidade de glicose no sangue. Deste modo, é evidente uma dificuldade em equilibrar valores e os níveis de glicose sobem. Fatores como sedentarismo, obesidade e genética influenciam o surgimento desta doença [151].

As alterações no metabolismo de glicose são transmitidos pela microbiota intestinal, podendo algumas populações da microbiota ter um papel ativo na patogénese do metabolismo da glicose [152].

Bactérias, envolvidas no controlo de inflamações e homeostasia, e os seus substratos, estão ligados com a ocorrência de diabetes Tipo 2. A genética do hospedeiro contribui para o perfil da microbiota intestinal, assim como hábitos alimentares, exposição a drogas e *stress* [153].

A microbiota intestinal dos diabéticos Tipo 2 é caracterizada pela diminuição de bactérias produtoras de butirato, incluindo *Roseburia* e *Eubacterium*, e um aumento em microrganismos patogénicos oportunistas, como se pode observar na Tabela 3. A redução destas bactérias e seus metabolitos no intestino aumenta a resistência à insulina e tolerância à glicose. O aumento de bactérias no intestino também inclui bactérias como *Escherichia* e *Lactobacillus*, que é redutora de sulfato [152], [153].

Tabela 3 Bactérias do trato intestinal associadas com a presença/ausência de Diabetes tipo 2. Adaptado de: [153].

	Aumento em Diabetes tipo 2	Diminuição em Diabetes tipo 2
Filo de bactérias intestinais		
<i>Firmicutes</i>	x	
<i>Bacteroidetes</i>		x
Espécies de bactérias intestinais	Aumento em Diabetes tipo 2	Diminuição em Diabetes tipo 2
<i>Roseburia</i>		x
<i>Eubacterium halii</i>		x
<i>Faecalibacterium prauznitzii</i>		x
<i>Lactobacillus gasseri</i>	x	
<i>Streptococcus mutans</i>	x	
<i>E. coli</i>	x	

O butirato ativa a expressão de genes que levam à regulação da glicemia e sensibilidade à insulina. Assim, a sua diminuição aumenta a tolerância à glicose e resistência à insulina. Além disso, o butirato possui efeitos metabólicos como da melhoria da atividade mitocondrial, ativação da glucogénese e prevenção da endotoxemia [153].

Deste modo, as funções da microbiota estão afetadas nos pacientes com diabetes Tipo 2, ao ocorrer um aumento na atividade de enzimas envolvidas no metabolismo de hidratos de carbono e redução de sulfato, no transporte membranar de açúcares e aminoácidos de cadeia ramificada. Por outro lado, há uma diminuição na síntese de butirato, vitaminas e de funções relacionadas com a mobilidade celular [152].

Os grãos de arroz que apresentam menor índice glicêmico podem ser utilizados para controlar e prevenir o diabetes. Sendo assim, as variedades com elevado teor em amilose devem ser utilizadas em dietas baseadas numa alimentação com baixo índice glicêmico [154]. No entanto, o arroz branco, que é o grão mais consumido, tem alteradas muitas características nutricionais quando é polido, podendo não ser a melhor opção em pessoas com diabetes [11].

3. Estágio

3.1. Trabalho desenvolvido na empresa

Ao longo do estágio desenvolvido na Novarroz- Produtos Alimentares, S.A. foram executadas diversas atividades, para dar depois continuidade na investigação realizada.

Inicialmente obtive conhecimento das políticas da empresa e da Legislação Portuguesa relativamente ao arroz.

Posteriormente, efetuei a preparação das amostras de arroz com descascamento, branqueio e separação dos grãos inteiros da trinca.

Realizei análise granulométrica dos grãos dividindo-os em grãos gessados, deformados, danificados, defeituosos, estriados e trinca.

Concretizei a caracterização das variedades de arroz tendo em conta as características físicas como comprimento, largura, razão comprimento-largura, percentagem área gessada, grau de brancura. Para além disso, também determinei as propriedades de viscosidade de cada variedade recorrendo ao *Rapid Visco Analyser* (RVA).

De modo a se determinar o tempo necessário para que o arroz se apresente homogeneamente cozido, realizei testes de cozedura.

Analisei os resultados das análises microbiológicas realizadas na empresa.

Por fim, também determinei a concentração de cloro presente na água da empresa, recolhida em diferentes zonas da mesma.

3.2. Trabalho desenvolvido na Universidade de Aveiro

Ao longo da investigação realizada na Universidade de Aveiro realizei análises ao teor de amido total, amido resistente, amilose, índice glicémico e GABA nas amostras testemunha e germinadas das variedades *japonica* e *indica*.

3.3. Novarroz- Produtos Alimentares, S.A.

A Novarroz- Produtos Alimentares, S.A. foi fundada em 1979, mas teve a sua atividade iniciada anos antes, na década de 60. Este começo consistiu num processo de produção tradicional com um pequeno moinho [1].

A empresa possui uma capacidade de armazenamento de 800 toneladas de arroz branqueado e 40000 toneladas de arroz em casca [1].

A qualidade superior do produto deve-se a uma longa parceria com orizicultores portugueses. Nesta empresa há um acompanhamento do processo da sementeira até à colheita, havendo uma seleção das sementes de maior qualidade em cada variedade [1].

A constante melhoria e crescimento da empresa nas últimas décadas colocam-na como um dos principais produtores de arroz da Europa. Isto deve-se não só tendo em conta o nível de qualidade, mas também o volume de produção [1].

4. Material e Métodos

4.1. Amostras de Arroz

O arroz analisado foi fornecido pela empresa Novarroz- Produtos Alimentares, S.A. Estas 4 amostras incluíam as subespécies *indica* e *japonica* e eram integrais e germinadas. Tendo em conta que os seus nomes reais e origem são dados confidenciais da empresa, estas informações estão codificadas, sendo separadas pela sua subespécie.

As amostras foram processadas no laboratório de controlo de qualidade da Novarroz- Produtos Alimentares S.A., de modo a se obter arroz integral e germinado para diferentes análises.

Na Tabela 4 podem-se visualizar as amostras analisadas, qual a sua variedade e o seu ano de colheita.

Tabela 4 Amostras de arroz para análise fornecidas pela Novarroz- Produtos Alimentares, S.A..

Amostra	Variedade	Ano de colheita
Indica 7-G	Agulha	2016- 2017
Indica 7-T	Agulha	2016- 2017
Japonica 16-G	Médio	2016-2017
Japonica 16-T	Médio	2016-2017

4.2. Determinação das características físicas dos grãos de arroz (Novarroz)

A determinação das características físicas dos grãos de arroz envolve a medição do seu comprimento e largura, determinação da relação comprimento-largura, brancura total e vítrea e análise do *Kett*.

As análises referentes às características físicas foram realizadas no laboratório de controlo de qualidade da Novarroz. Para estas análises utilizou-se o equipamento *S2I Rice*

Statistic Analyser, que se pode observar na FIG. 13 [155]. Este equipamento possui uma estrutura física e um programa informático. A primeira estrutura permite a separação dos grãos de arroz numa rampa com vibração, e, através de uma câmara, captura imagens individuais dos grãos. O programa informático fornece os resultados da quantificação estatística da amostra, os seus defeitos (trinca, gessados e danificados), comprimento e largura dos grãos e valor da brancura vítrea e total. Deste modo consegue-se a caracterização das variedades de arroz analisadas [155].



FIG. 13 Equipamento S21 Rice Statistic Analyser.

Para se determinar o grau de brancura *Kett* utilizou-se o modelo medidor de brancura *Kett* C300/C100, que se pode observar na FIG. 14 [156]. Este equipamento mede, no momento, a brancura do grão ou da farinha. É utilizado como valor de referência de brancura para o arroz branco o intervalo entre 38 a 39 graus *Kett*. Para o arroz integral o valor é entre 23 a 24 graus *Kett*. Assim, quanto maior for o valor obtido na leitura maior é a brancura da amostra [157].



FIG. 14 Modelo medidor de brancura Kett C300/C100.

4.3. Determinação do valor de humidade das amostras (Universidade Aveiro)

De modo a se obter o valor de humidade das amostras recorreu-se ao liofilizador VirTis, modelo *benchtop* K.

As amostras foram moídas e peneiradas num peneiro de 1000 mm. Foram pesadas 5 g num porta-amostras, juntamente com a tampa, e congeladas.

Ao fim de dois dias foram colocadas no liofilizador e permaneceram neste durante cinco dias. Após este intervalo de tempo as amostras voltaram a ser pesadas.

O valor de humidade obteve-se com a seguinte equação:

Equação 1 Cálculo do valor de humidade tendo em conta os valores pesados, antes e após a liofilização.

$$\% \text{ Humidade} = \frac{\text{peso inicial} - \text{peso final}}{\text{peso inicial}}$$

4.4. Determinação da viscosidade das amostras (Novarroz)

A determinação da viscosidade das amostras envolveu o equipamento *Rapid Visco Analyser* (RVA), modelo *TecMaster*, que se encontrava no laboratório de controlo de qualidade da empresa Novarroz, que se pode observar na FIG. 15. Este aparelho tem a capacidade de, através de um viscómetro rotacional, analisar continuamente a viscosidade de uma amostra numa temperatura controlada. O equipamento está ligado ao programa *Thermocline* para *Windows* (TCW), que permite arrefecer e aquecer as amostras consoante o escolhido no programa [158]. As determinações ocorreram de acordo com a *American Association of Cereals Chemistry* (AACC) [159].

Os parâmetros obtidos a partir da análise da farinha do arroz são o pico da viscosidade, a vala, *pasting temperature*, *breakdown*, retrogradação e viscosidade final. Estes valores indicam a gelatinização e características de viscosidade da amostra [158]. O método utilizado baseia-se no aquecimento e agitação da suspensão aquosa, que se encontra num recipiente de metal que se insere no aparelho, com posterior arrefecimento. Esta diferença de temperaturas tem o objetivo de causar mudanças na viscosidade da suspensão [158]. Para se iniciar a análise ligou-se o equipamento *Rapid Visco Analyser* (RVA), modelo *TecMaster*, assim como o computador e o programa de controlo. Realizou-se um teste sem recipiente de metal inserido, de modo a ser realizado um aquecimento do RVA. Após o teste inicial foi efetivado o zero, no qual a turbina tinha de estar inserida na máquina. O teste decorre do modo que foi escolhido no programa tendo em conta o tempo e ciclo de temperatura referidos na AACC [159]. Para se proceder foi necessário inserir o valor de humidade da amostra a analisar, de modo a que o programa calcule a proporção de água destilada e de amostra que é necessário pesar para formar a solução aquosa [158]. A amostra em farinha que foi pesada para análise, foi peneirada a 0.500 mm. Colocou-se a solução constituída pela água destilada e farinha de arroz no recipiente de metal, e inseriu-se esta com a turbina na máquina. A solução foi misturada vigorosamente até a farinha se dissolver na água [158].



FIG. 15 Equipamento Rapid Visco Analyser, modelo TecMaster.

Inicialmente a temperatura apresentava um valor de 50.0 °C durante 1 minuto. Posteriormente aumentou 14 °C por minuto até atingir os 95.0 °C, onde permaneceu durante 3 minutos e 45 segundos. De seguida, a temperatura começou a diminuir atingindo 50.0 °C em 3 minutos e 51 segundos. A mistura foi dispersa ao ser difundida durante 10 segundos a 960 rpm. A viscosidade foi medida com velocidade de rotação de 160 rpm. No final obteve-se uma curva de RVA que demonstra as fases pelas quais a solução passa [158]. Na FIG. 16 pode-se observar uma curva típica de RVA, após a realização de um teste.

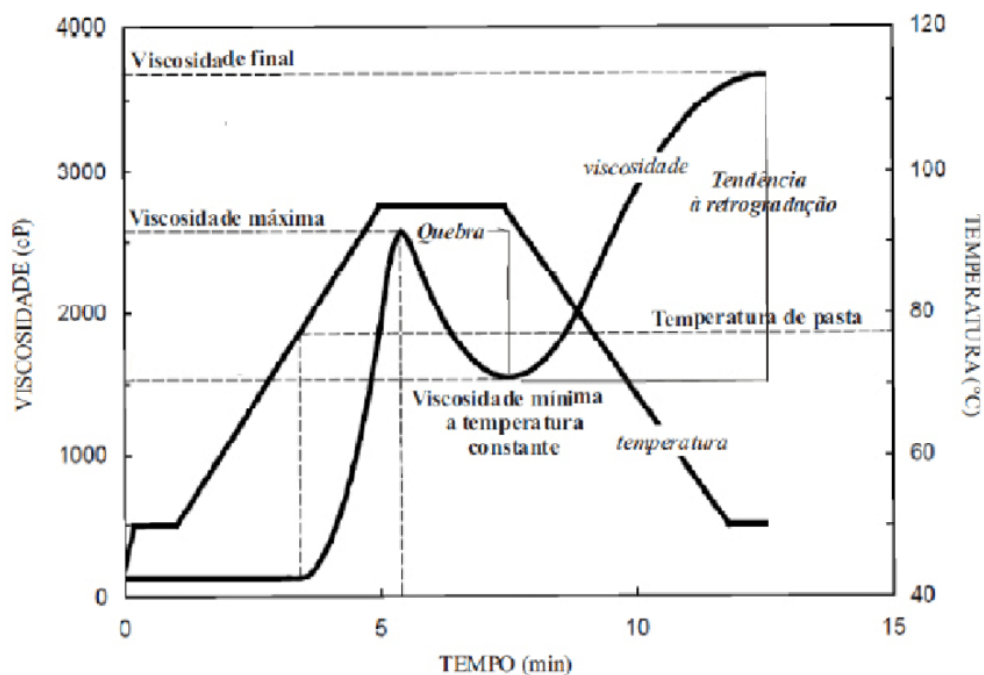


FIG. 16 Curva típica de RVA, obtida após a realização de um teste [184].

Além desta curva é-nos fornecido o valor do pico da viscosidade, vala, viscosidade final, *breakdown*, retrogradação e *pasting temperature*. O pico é o valor de viscosidade máxima que se atinge. A vala é a viscosidade mínima que a amostra atinge após o pico. A viscosidade final corresponde ao valor da viscosidade no fim do teste. O *breakdown* é a diferença entre o pico e a vala, e está relacionado com a estabilidade do amido ao calor e à rotação. A retrogradação do pico corresponde à diferença entre a viscosidade final e o pico. A retrogradação da vala é a diferença entre a viscosidade final e a vala. Este valor é um indicador do amido em retrogradação. A *pasting temperature* é a temperatura a que a amostra se encontra quando atinge o pico, sendo esta normalmente os 95 °C [160].

Tabela 5 Ciclo de tempo e temperatura necessários para se obter o perfil de viscosidade de Oryza sativa.

	Temperatura (°C)	Tempo (min:seg)
1º	50.0	1:00
2º	95.0	4:45
3º	95.0	7:15
4º	50.0	11:06
Fim do teste		12:30

4.5. Determinação do conteúdo em amido total (Universidade Aveiro)

A determinação do amido total foi de acordo Soares (2014) [104].

Foram moídos e pesados 25 a 35 mg de arroz peneirado a 0.500 mm, havendo uma amostra que foi anteriormente liofilizada e outra que se encontrava no estado natural. Foram adicionados 2mL de KOH 2M à amostra, e a solução foi deixada sob agitação durante 72 horas a temperatura ambiente.

Foram adicionados à solução 1-5 mL de HCl 2 M, 3 mL de tris-maleato 0.6 M com pH igual a 6.9 e 1 mL de α -amilase 40 mg/mL em tampão tris-maleato. A solução foi deixada sob agitação durante 48 horas a temperatura ambiente.

Foi adicionado 1mL de tampão acetato 0.4 M com pH igual a 4.75. 100 µl de alíquota foram retirados da solução e colocados num *eppendorf*. Neste foram adicionados 50 µl de amiloglucosidade 30 mg/5mL em tampão acetato de sódio. As alíquotas foram retiradas em triplicado e deixadas 12 horas a 60 °C. Posteriormente as alíquotas foram centrifugadas durante 1 minuto a 10000 rpm na *Microcentrifuge Denver Instrument Company force 7 7200 g*, sendo utilizado o sobrenadante.

Para a determinação do amido total recorreu-se ao *kit* GOD-POD. Utilizaram-se 10 µL de amostra e 300 µL de GOD-POD que foram analisados a um comprimento de onda de 510 nm durante 20 minutos a 44 °C. A microplaca obtida após este teste pode-se observar na FIG. 17. Os valores obtidos na absorvância foram tratados com o programa *Excel*.

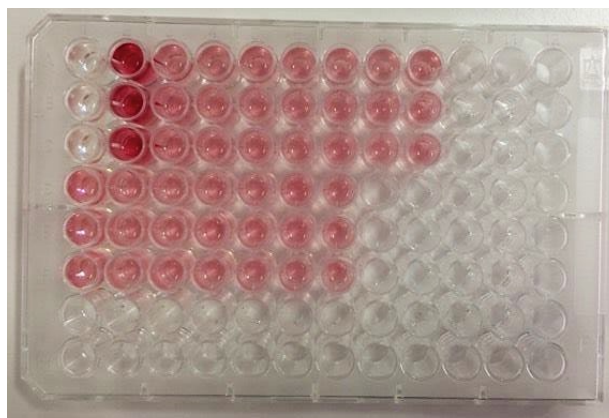


FIG. 17 Microplaca de leitura de absorvância para análise do amido total.

4.6. Determinação do amido resistente (Universidade Aveiro)

A quantificação do amido resistente foi de acordo com o trabalho desenvolvido por Soares (2014) [104].

Foram moídos e pesados 100 mg de arroz peneirado a 1.000 mm. Sob agitação foram adicionados 2 mL HCl-KCl 25 mM com pH igual a 4.5, e 200 µl de pepsina 1 g/10 mL em tampão HCl-KCl 25 mM, com pH igual a 1.5. A solução permanece a 40 °C durante 60 minutos. Após a solução arrefecer são adicionados, sob agitação, 15 µl de NaOH 3 M, 2.98

mL de tris-maleato com pH igual a 6.9 e 1 mL de α -amilase 40 mg/mL em tampão tris-maleato. A solução permaneceu a temperatura ambiente durante 72 horas, sob agitação.

Foram adicionados 300 μ L de HCl 6 M, 2.8 mL de tampão acetato 0.4 M com pH igual a 4.75 e 400 μ L de amiloglucosidade 30 mg/5 mL. A solução permaneceu durante 12 horas a 60 °C, sob agitação.

As amostras foram colocadas na centrífuga a 3000 rpm durante 10 minutos. Foi retirado o sobrenadante e o resíduo lavado com etanol 50% 2.5 mL. A solução foi colocada no vórtex. Este procedimento foi realizado três vezes. Sob agitação adicionou-se 1.2 mL de KOH 2 M e foi deixado a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Foi adicionado 0.907 mL de HCl 2 M. Foram colocados 300 μ L de alíquota num *eppendorf*, juntamente com 700 μ L de tampão acetato 0.4 M com pH igual a 4.75 e 50 μ L de amiloglucosidade em tampão acetato. As alíquotas foram retiradas em triplicado. Permaneceram a 60°C durante 12 horas. Posteriormente as alíquotas foram centrifugadas durante 1 minuto a 10000 rpm na *Microcentrifuge Denver Instrument Company force 7 7200 g*, sendo utilizado o sobrenadante.

Para determinar o amido resistente recorreu-se ao kit GOD-POD. Utilizaram-se 10 μ L de amostra e 300 μ L de GOD-POD que foram analisados a um comprimento de onda de 510 nm durante 20 minutos a 44 °C. A microplaca obtida após este teste pode-se observar na FIG. 18. Os valores obtidos na absorvância foram tratados com o programa *Excel*.



FIG. 18 Microplaca de leitura de absorvância de amido resistente.

4.7. Determinação do conteúdo de amilose (Universidade Aveiro)

A determinação do conteúdo de amilose foi de acordo com ISO 6647, recorrendo-se a algumas otimizações [161].

Foram moídos e pesados 100 mg de arroz peneirado a 0.180 mm e da amostra padrão. À amostra foram adicionados 1 mL de etanol 95% e 9 mL de NaOH 1M. A solução permaneceu no *orbital shaker* a 180 rpm durante 48 horas.

A solução foi colocada a 100 °C durante 20 minutos. Após ser retirada, foram transferidos para balões volumétricos de 100 mL as amostras, e o volume perfeito com água destilada. A solução foi agitada vigorosamente.

Foi preparada uma solução de iodo. Para esta solução foram adicionadas 2000 ± 5 mg de iodeto de potássio, água ao ponto de a solução ser saturada, 200 ± 1 mg de cristais de iodo. Dissolveu-se bem a solução e tapou-se o frasco com alumínio. A solução foi transferida para um balão de 100 mL, perfeita com água e homogeneizada.

Foram preparados três tubos de ensaio para cada amostra. Em cada tubo de ensaio foi adicionado 0.5 mL da amostra preparada, 5 mL de água destilada, 0.1 mL de ácido acético 1 M, 0.2 mL de solução de iodo, 4.20 mL de água destilada. A solução resultante foi colocada no vórtex.

Para determinar o conteúdo de amilose recorreu-se ao *kit* GOD-POD. Utilizaram-se 10 µL de amostra e 300 µL de GOD-POD que foram analisados a um comprimento de onda de 620 nm. Os valores obtidos na absorvância foram tratados com o programa *Excel*.

4.8. Determinação do índice glicémico (Universidade Aveiro)

A determinação da taxa da digestão do amido, com o objetivo de modo obter o índice glicémico, foi de acordo com Goñi *et al.* (1997), com otimizações, estando as amostras preparadas de dois modos diferentes [162].

Foram pesadas 50 mg da amostra e foram adicionados 5 mL de água destilada e a solução foi colocada em banho maria a 100 °C durante 30 minutos.

A solução foi vertida para um copo juntamente com 5 mL de HCl-KCl 50 mM a pH de 1.5. A solução foi homogeneizada usando o *Ultra-turrax T25 IKA-WERKE*. Foi adicionada pepsina 1 g/10 mL e colocada num banho a 60 °C sobre agitação, durante 60 minutos.

Foi adicionada à solução 100 µL de NaOH 3 M, 14.9 mL de tampão tris-maleato, com pH igual a 6.9 e 5 mL de α-amilase 12.5 mg/100 mL em tampão tris-maleato, sob agitação. Foram transferidos 1000 µL desta solução para sete tubos de ensaio diferentes, correspondentes ao intervalo de tempo em que se mede a atividade da enzima. Estes foram colocados a uma temperatura de 37 °C e as alíquotas foram retiradas aos 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos. Passado a inativação da enzima, as amostras foram colocadas a 60 °C durante 45 minutos, e depois centrifugadas durante 1 minuto a 10000 rpm, sendo depois utilizado o sobrenadante.

Para determinar o índice glicêmico recorreu-se ao *kit* GOD-POD. Utilizaram-se 10 µL de alíquota e 300 µL de GOD-POD que foram analisados a um comprimento de onda de 510 nm durante 20 minutos a 44 °C. Os resultados obtidos de absorvância são analisados recorrendo-se ao programa *Excel*.

A taxa de amido digerido foi expressa como a percentagem de amido hidrolisado durante o intervalo de tempo em que a amostra foi retirada. Esta foi representada na curva de hidrolise, onde a área de baixo da curva de hidrolise (AUC) foi calcula usando a regra de Simpson composta. Segundo a relação entre AUC da amostra e AUC do padrão, obteve-se o índice de hidrolise (HI).

O índice glicêmico foi obtido de acordo com o modelo de Goñi, segundo a Equação 2.

Equação 2 Cálculo para obtenção do índice glicêmico.

$$IG = 39.71 + (0.549 * HI)$$

Após a obtenção destes resultados voltou-se a calcular o IG segundo um novo método. Este método é baseado na rotulagem de uma variedade comercial, que indica a imersão dos grãos antes da sua cozedura.

Inicialmente as 50 mg de amostra foram colocadas sob imersão com 136 µl de água destilada, durante uma hora. Foram adicionados 5 mL de água destilada e a solução foi colocada em banho maria a 100 °C durante 30 minutos.

A solução foi vertida para um copo juntamente com 5 mL de HCl-KCl 50 mM a pH de 1.5. A solução foi homogeneizada usando o *Ultra-turrax T25 IKA-WERKE*. Foi adicionada pepsina 1 g/10 mL e colocada num banho a 60 °C sobre agitação, durante 60 minutos.

Foi adicionada à solução 100 µL de NaOH 3 M, 14.9 mL de tampão tris-maleato, com pH igual a 6.9 e 5 mL de α -amilase 12.5 mg/100 mL em tampão tris-maleato, sob agitação. Foram transferidos 1000 µL desta solução para sete tubos de ensaio diferentes, correspondentes ao intervalo de tempo em que se mede a atividade da enzima. Estes foram colocados a uma temperatura de 37 °C e as alíquotas foram retiradas aos 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos. Passada a inativação da enzima, as amostras foram colocadas a 60 °C durante 45 minutos, e depois centrifugadas durante 1 minutos a 10000 rpm, sendo depois utilizado o sobrenadante.

Para determinar o índice glicêmico recorreu-se ao *kit* GOD-POD. Utilizaram-se 10 µL de alíquota e 300 µL de GOD-POD que foram analisados a um comprimento de onda de 510 nm durante 20 minutos a 44 °C. Os resultados obtidos de absorvância são analisados recorrendo-se ao programa *Excel* e à equação 2. Para a obtenção destes resultados utilizou-se o valor de amido total da amostra não liofilizada na variedade sem imersão, e o da amostra liofilizada aquando da imersão.

4.9. Processo de germinação (Novarroz)

O processo de germinação ocorre durante 9 horas, na presença de água, e em condições de stress para o grão de *Oryza sativa*.

Por motivos de confidencialidade o procedimento realizado não pode ser descrito.

4.10. Análise microbiológica (Novarroz)

As mudanças no microbioma entre o arroz sem imersão, com imersão de uma hora e após germinação, foram analisadas com enumeração de microrganismos totais a 30° C,

Escherichia coli, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp., Enterobacteriaceae, bolores e leveduras de acordo com os métodos ISO (*International Organization for Standardization*) [163]–[168].

4.11. Determinação conteúdo GABA (Universidade Aveiro)

A determinação do conteúdo de GABA é realizada nas quatro amostras. Foi escolhida uma amostra *indica* integral e uma *japonica* integral, e analisado o seu conteúdo nas variedades germinadas e nas mesmas variedades, mas sem germinação, de modo a serem os valores obtidos nesta utilizados como controlo.

A verificação do aminoácido GABA no arroz integral germinado foi tentada por FTIR e IC-UV/VIS.

A determinação por FTIR é qualitativa e ocorre a partir da utilização de uma solução padrão de GABA, compara-se o espectro obtido desta solução padrão, como se por de observar na FIG. 19, com os restantes espectros de modo a se saber se o arroz estava enriquecido em GABA [169].

A solução padrão de GABA foi realizada com 5 µg de GABA com água destilada. Esta solução foi centrifugada durante 3 minutos a 10000 rpm, até a solução se tornar homogénea.

Colocaram-se grãos de arroz esmagados em imersão em água destilada durante uma hora. Esta solução foi centrifugada durante 3 minutos a 10000 rpm, até a solução se tornar homogénea.

Uma gota da solução é colocada no FTIR e é analisada no mesmo. Os espectros são sobrepostos e aí comparam-se os picos que surgem. Verifica-se se no local onde a solução padrão possui o seu maior pico, se o resto das amostras também possui esse pico.

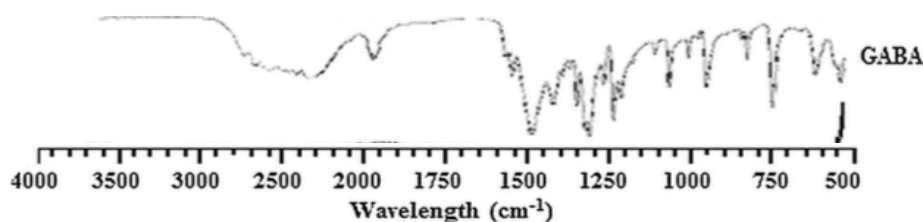


FIG. 19 Espectro padrão de GABA puro [169].

5. Resultados e discussão

5.1. Humidade das amostras

O valor da humidade das amostras tem bastante importância para se saber a qualidade do produto. Segundo o Decreto-Lei nº63/2000 o arroz não pode ter humidade superior a 14% [170]. Na presença de um valor superior a este, a atividade da água (a_w) será maior. Consequentemente, a proliferação de microrganismos será mais propensa no produto. Ocorre uma diminuição da qualidade do produto, podendo-se tornar danoso para a saúde do consumidor.

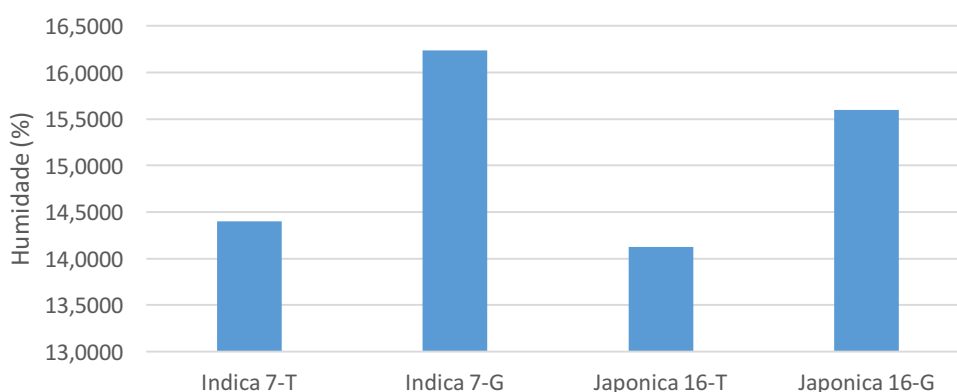


FIG. 20 Gráfico referente aos valores de humidade (%) das amostras em matéria seca.

Os valores obtidos podem-se observar na FIG.20.

As amostras que apresentam valores mais reduzidos são as testemunho (Japonica 16-T e Indica 7-T) com 14.121% e 14.400%.

As amostras com valores mais elevados são as germinadas, com 16.239%, 15.598%.

As amostras foram colocadas em imersão durante uma hora apresentando valores de humidade muito mais elevados, do que quando não sujeitas a imersão. Estes valores estão bastante distanciados do valor estabelecido pelo Decreto de Lei nº63/2000, 14%.

Na FIG. 21 pode-se visualizar a comparação entre a humidade (%) das amostras antes de imersão e após imersão durante uma hora. Verifica-se um aumento significativo no valor da humidade em todas as amostras.

Os valores mais reduzidos verificaram-se nas amostras germinadas com 17.547% e 19.187%.

As amostras com valores mais elevado foram as testemunho, com 33.764% e 20.816%.

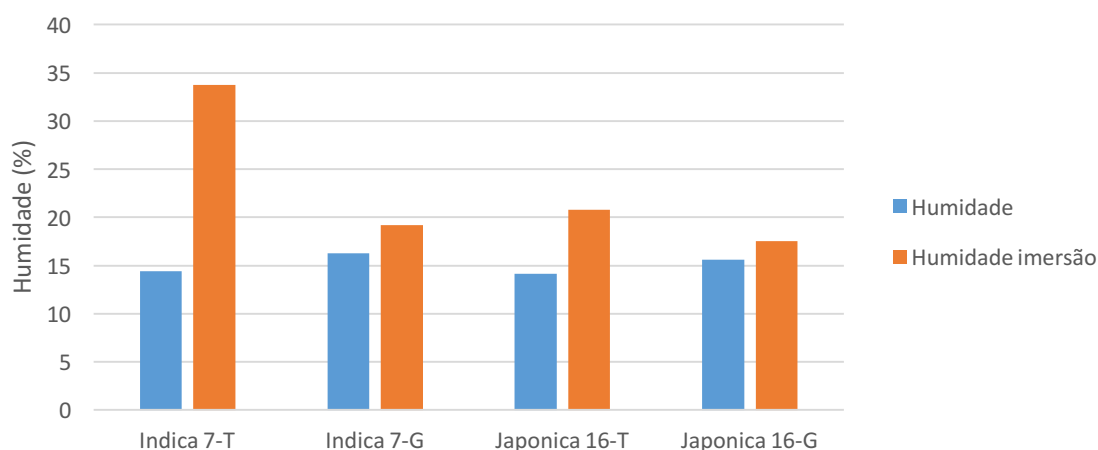


FIG. 21 Gráfico referente à comparação entre os valores de humidade (%), em matéria seca, obtidos sem e com imersão de uma hora.

A amostra que aumentou menos o valor da humidade foi Japonica 16-G, com aumento de 2.948%.

A amostra que aumentou mais o valor de humidade foi Indica 7-T, com aumento de 18.764%.

Verifica-se que a absorção de água ocorre quando o arroz está em imersão durante uma hora, através do aumento do valor da humidade. Este aumento também é verificado nas variedades germinadas, tanto antes da imersão, devido ao processo de germinação que inclui contacto com água, como após a imersão, demonstrando a capacidade que o grão de arroz possui para absorver água [106].

Estes valores verificam que ocorre um aumento da atividade de água nestas variedades [156]. Quanto maior a atividade de água nas variedades, maior a possibilidade de proliferação de microrganismos que podem ser produtores ou gerar GABA.

5.2. Relação comprimento-largura

O arroz é classificado segundo a dimensão dos seus grãos. Os grãos de comprimento inferior ou igual a 5.2 mm e relação comprimento-largura inferior a 2 são denominados grãos curtos. Os grãos com comprimento superior a 5.2 mm e inferior a 6.0 mm, e relação comprimento-largura inferior a 3 são denominados de grãos médios. Os grãos denominados longos têm comprimento superior a 6.0 mm e relação comprimento-largura superior a 3 [172].

A avaliação do tamanho dos grãos das duas variedades e seu correspondente germinado, baseou-se na medição do comprimento, largura, e da razão entre estes dois parâmetros. Os resultados destas medições podem ser observados na FIG. 22 e FIG. 24.

Os valores mais reduzidos de comprimento ocorreram na amostra Japonica, mais justamente em Japonica 16-G e Japonica 16-T, com 5.299 mm e 5.317 mm, respetivamente.

Verificaram-se valores mais elevados de comprimento na amostra Indica, mais precisamente Indica 7-T e Indica 7-G, com 6.613 mm e 6.471 mm, respetivamente.

Os valores de largura foram mais baixos na amostra Indica, mais precisamente Indica 7-G e Indica 7-T, com 1.905 mm e 1.948 mm, respetivamente.

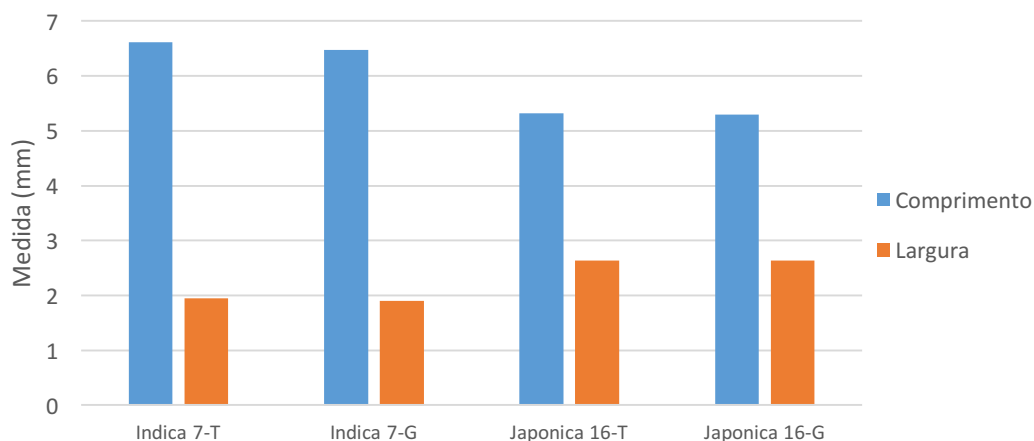


FIG. 22 Comprimento (mm) e largura (mm) das amostras.

Os resultados de largura mais elevados ocorreram em Japonica, mais justamente Japonica 16-G e Japonica 16-T, com 2.634 mm e 2.634 mm, respetivamente.

Através da observação da FIG. 23, verifica-se que existe uma correlação do coeficiente de Pearson negativa entre estas duas características. Esta correlação está representada na

equação e tem o valor de r igual a -0.992252131 . Isto significa que quanto maior for o comprimento do grão de arroz, menor vai ser a sua largura.

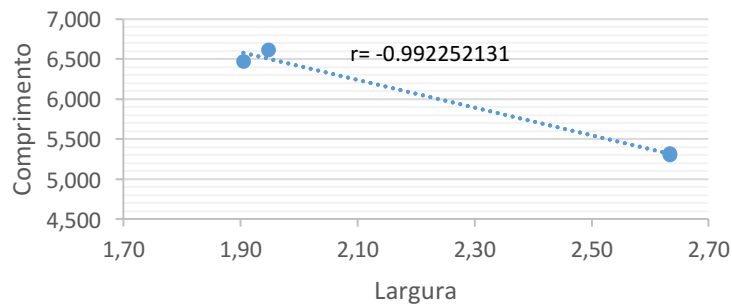


FIG. 23 Correlação do coeficiente de Pearson entre o comprimento e a largura das amostras.

Pode-se observar na FIG. 24 que a amostra que apresenta uma menor relação é Japonica 16-G com 2.012.

Também é possível observar na FIG. 24 que a amostra que apresenta uma maior relação comprimento-largura é Indica 7-G com 3.397.

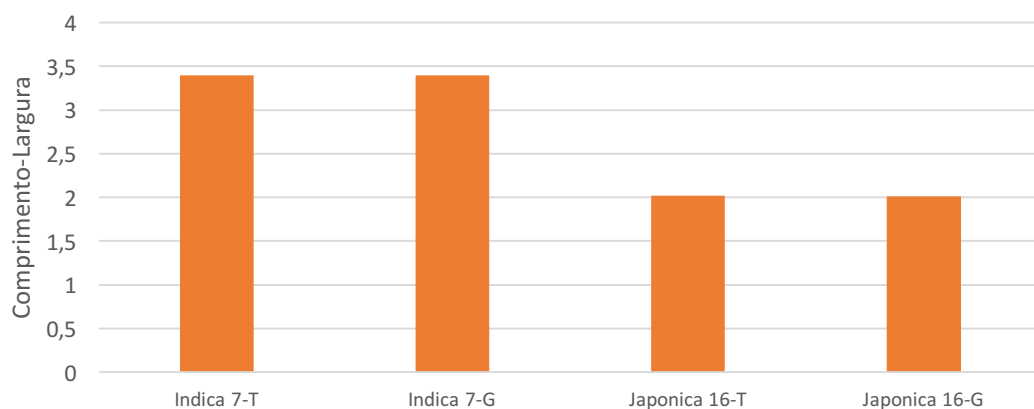


FIG. 24 Relação comprimento-largura (mm) das amostras.

Existe uma correlação do coeficiente de Pearson positiva entre o comprimento das amostras e a relação comprimento-largura, que pode ser observada na FIG. 25. O valor desta correlação está representado na equação, e é de 0.996595881 . Isto significa que quanto maior for o comprimento das amostras, maior é a relação comprimento-largura das mesmas.

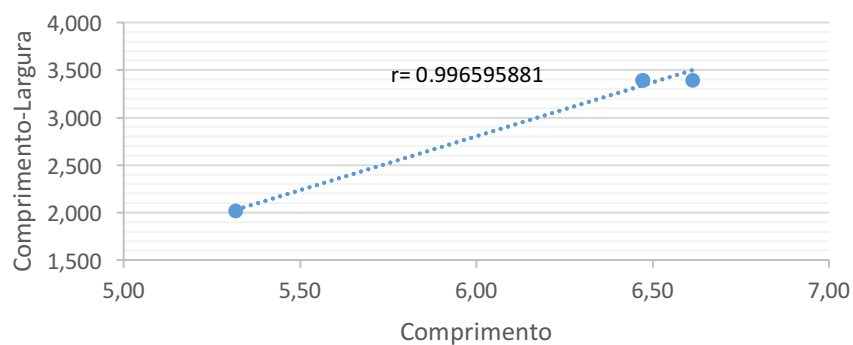


FIG. 25 Correlação do coeficiente de Pearson entre o comprimento e a relação comprimento-largura das amostras.

Relativamente à correlação entre a largura e a relação comprimento-largura, pode-se verificar na equação da FIG. 26, que esta tem valor negativo de -0.999116999. Ou seja, quanto maior for a largura dos grãos menor será a relação comprimento-largura dos mesmos.

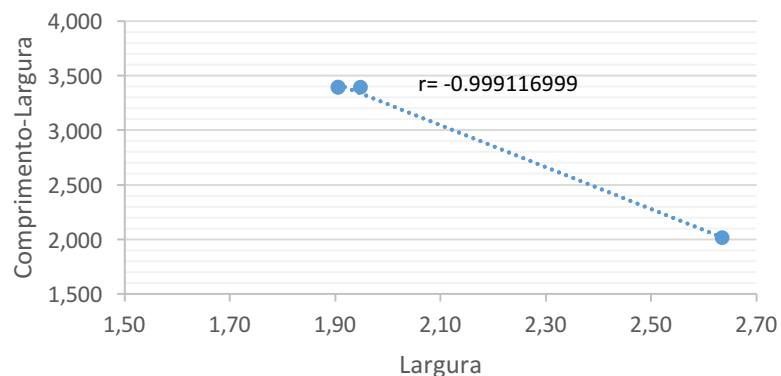


FIG. 26 Correlação do coeficiente de Pearson entre a largura e a relação comprimento-largura das amostras.

O comprimento, a largura e a sua relação obtida nos grãos de *Oryza sativa* analisados verificaram a divisão que é realizada entre *indica* e *japonica* com base nesta característica [93].

Os valores obtidos em relação às variedades testemunho (Indica 7-T e Japonica 16-T) e às variedades germinadas (Indica 7-G e Japonica 16-G) demonstraram que ocorre um pequeno aumento da largura e diminuição do comprimento das variedades germinadas. A relação comprimento-largura manteve-se igual entre as variedades testemunho e as germinadas.

As alterações mínimas dos valores de comprimento e largura entre as variedades testemunho e germinadas é explicada pela perda da camada de película que ocorre durante o processo de germinação. Assim, apesar da absorção de água levar a um pequeno aumento de volume do grão, a perda da camada integral leva a que o valor final destas características, das variedades germinadas, se mantenha equivalente aos das variedades testemunho.

Estes valores demonstram que as amostras apresentam uma estrutura diferente. As amostras *japonica*, ao possuírem uma relação mais reduzida têm um grão com uma dimensão arredondada, enquanto que as *indica*, ao possuírem uma relação maior, têm um grão com uma dimensão mais fina. Estes valores de dimensão obtidos correspondem à denominação comercial que lhes é fornecida, carolino e agulha, respetivamente. Estes resultados correspondem à divisão dos diferentes tipos de arroz de acordo com estas características. As variedades *japonica*, comercializadas como arroz carolino, apresentam menor comprimento, maior largura e menor relação comprimento-largura. Por sua vez, as variedades *indica*, comercializadas como arroz agulha, apresentam maior comprimento, menor largura e relação comprimento-largura superior a 3. Podem ser assim denominadas amostras de grão longo [172].

5.3. Análise brancura

As amostras após serem sujeitas à análise para se saber o valor de *kett*, brancura vítrea, brancura total e área gessada apresentaram diversos resultados, que podem ser observados na FIG. 27, FIG.28 e Tabela 5.

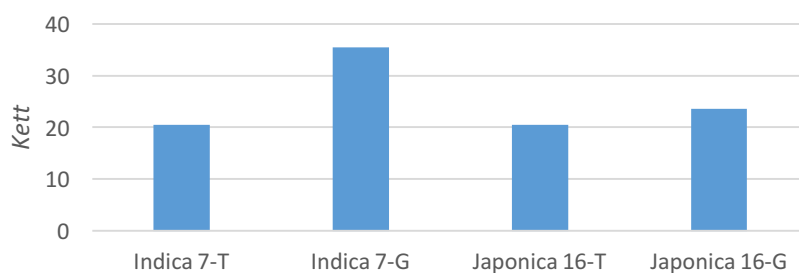


FIG. 27 Valor de Kett das amostras.

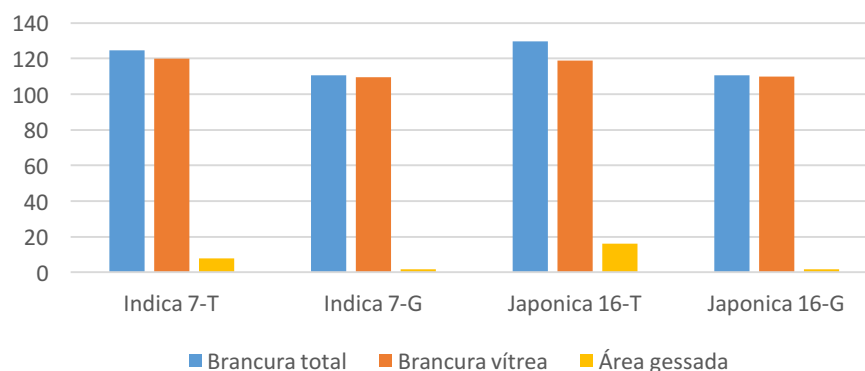


FIG. 28 Valores de brancura vítrea, brancura total e % de área gessada das amostras.

Os valores obtidos na análise destas três propriedades físicas, são consistentes entre si, como se pode observar na FIG. 28 e Tabela 6. Ou seja, as amostras que apresentaram valores mais reduzidos de brancura vítrea também apresentaram mais reduzidos de brancura total e de área gessada (FIG. 28). Assim como as que apresentaram valores mais elevados de brancura vítrea também apresentaram mais elevados de brancura total e área gessada (FIG. 28).

Tabela 6 Resultados das análises realizadas às amostras referentes ao kett, brancura vítrea, brancura total e área gessada (%).

Variedades	Kett	Brancura vítrea	Brancura total	Área gessada (%)
Indica 7-T	20,5	120,06	124,72	8,03
Indica 7-G	35,5	109,51	110,67	1,84
Japonica 16-T	20,5	119,01	129,4900	16,28
Japonica 16-G	23,6	110	110,6700	1,84

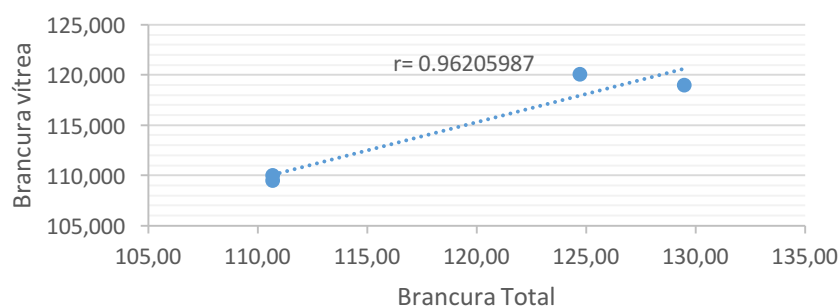


FIG. 29 Correlação entre brancura total e brancura vítrea das amostras.

A FIG. 29 demonstra a correlação entre a brancura total e brancura vítrea das amostras. Pode-se verificar uma correlação do coeficiente de Pearson positiva entre estas características, com r igual a 0.96205987, tal como está representado na equação da FIG. 29, mostrando uma forte correlação entre estas características. Isto significa que quanto maior for a brancura total, maior será a brancura vítrea da amostra.

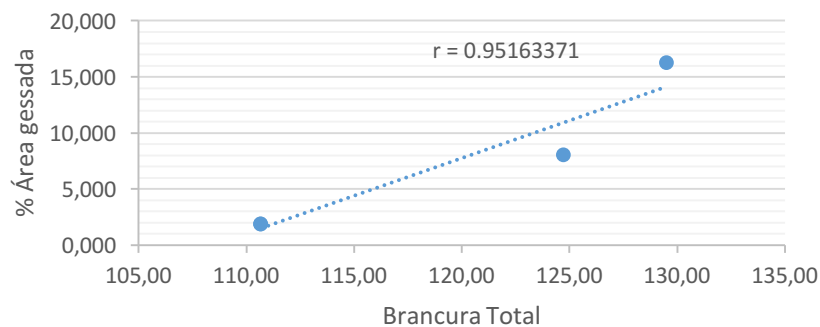


FIG. 30 Correlação do coeficiente de Pearson entre brancura total e área gessada (%).

A brancura total e área gessada das amostras apresentam uma correlação do coeficiente de Pearson positiva, tal como pode ser comprovado na equação da FIG. 30, onde r tem o valor de 0.95163371, mostrando uma forte correlação entre estas características. Deste modo, quanto maior a brancura total das amostras, maior será a área gessada das mesmas.

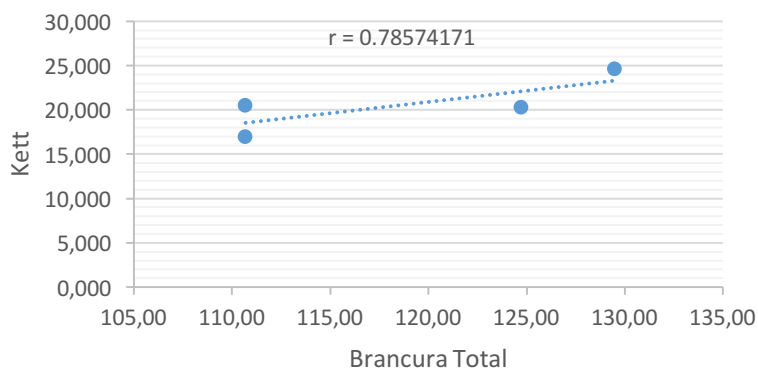


FIG. 31 Correlação do coeficiente de Pearson entre brancura total e Kett das amostras.

A brancura total e o *kett* das amostras mostram uma correlação do coeficiente de Pearson positiva entre si. Isto pode ser verificado na FIG. 31, tanto na apresentação dos dados, como na equação que se encontra presente, em que r tem o valor de 0.78574171, mostrando uma

forte correlação entre estas características. Segundo estes dados, quanto maior for a brancura total das amostras, maior será o valor de *kett* das mesmas.

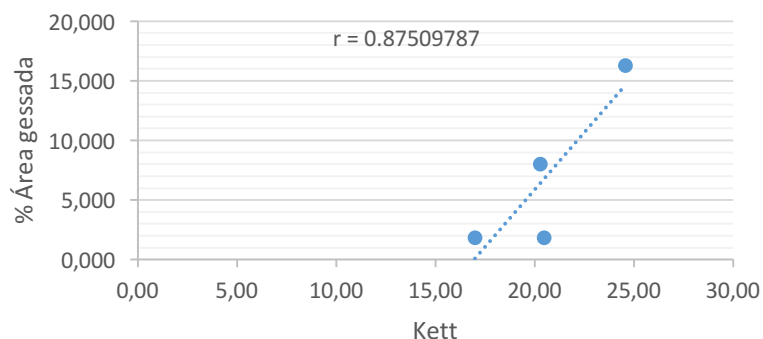


FIG. 32 Correlação do coeficiente de Pearson entre Kett e área gessada (%) das amostras.

Por sua vez, o valor de *kett* possui uma correlação do coeficiente de Pearson positiva com a área gessada dos grãos. Pode-se verificar no gráfico da FIG. 32, que quanto maior é o valor de *kett*, maior é a área gessada apresentada. Estes dados são também confirmados pelo valor de *r* igual a 0.87509787, que se apresenta na equação da FIG. 32.

Por último, a área gessada (%) e a brancura vítrea possuem uma correlação positiva, como se pode observar no valor de *r* igual a 0.83018954, na FIG.33. Quanto maior for a área gessada maior será a brancura vítrea.

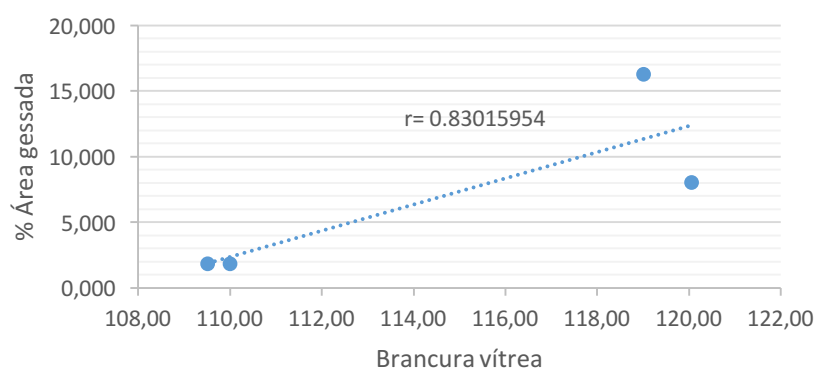


FIG. 33 Correlação do coeficiente de Pearson entre área gessada (%) e brancura vítrea das amostras.

O valor de brancura é maior quanto menor for a camada integral e mais branqueado estiver o grão [149]. As variedades testemunho possuem valor mais baixo de *kett* [149].

Após a germinação, constata-se o aumento do valor de *kett*, o que é justificado pela perda parcial da camada integral.

As variedades germinadas possuem menor % de área gessada e os valores de brancura total e vítrea são mais próximos. Por outro lado, nas variedades testemunho a % de área gessada é maior e os valores de brancura vítrea e brancura total são mais díspares. Estes valores podem ser explicados pela homogeneização dos grãos de arroz durante a germinação.

5.4. Perfil viscosidade

Através da análise da viscosidade das diferentes variedades de arroz, pode-se compreender o comportamento destas após a cozedura [173]. Esta propriedade analisada pelo RVA, torna-se assim bastante importante para determinar a qualidade do arroz [174].

A transformação do amido ocorre após a gelatinização dos grânulos, absorção de água, perda de componentes moleculares e, por fim, quebra dos mesmos, processos que ocorrem a diferentes temperaturas durante um diferente intervalo tempo, como se pode observar na Tabela 7 [175].

Tabela 7 Ciclo de tempo e temperatura necessários para se obter o perfil de viscosidade de Oryza sativa.

	Temperatura (°C)	Tempo (min:seg)
1°	50.0	1:00
2°	95.0	4:45
3°	95.0	7:15
4°	50.0	11:06
Fim do teste		12:30

Determinar o perfil de viscosidade dos alimentos torna-se importante ao permitir simular o processo de cozedura para melhorar as propriedades funcionais [175].

O pico da viscosidade é a medida que permite indicar a capacidade do amido reter água em termos da resistência dos grânulos após absorção de água. Também reflete o início da destruição da estrutura dos grânulos após não serem capazes de absorver mais quantidade de água [175].

Nas Tabelas 8 a 9 e FIG. 34 a 40 podem-se observar os resultados obtidos nas análises aos diferentes parâmetros do perfil de viscosidade (pico, vala, *breakdown*, viscosidade final, retrogradação, tempo do pico e *pasting temperature*).

Tabela 8 Resultados obtidos nos parâmetros do perfil de viscosidade (pico, vala, breakdown e viscosidade final) das quatro amostras analisadas.

Variedades	Pico (cP)	Vala (cP)	Breakdown (cP)	Viscosidade Final (cP)
Indica 7-T	424	428	-4	1444
Indica 7-G	547,5	551	-5	1290
Japonica 16-T	1217	855	362	1686
Japonica 16-G	1324,5	1270	45,5	2260

Tabela 9 Resultados obtidos nos parâmetros do perfil de viscosidade (retrogradação, tempo do pico e pasting temperature) das quatro amostras analisadas.

Variedades	Retrogradação (cP)	Tempo do Pico (min)	Pasting Temperature (° C)
Indica 7-T	1020	7	95
Indica 7-G	737	7	93,8
Japonica 16-T	469	6,0333	90,2
Japonica 16-G	945,5	6,234	91,725

Na FIG. 34 podem-se observar os valores do pico da viscosidade obtidos para as diferentes variedades.

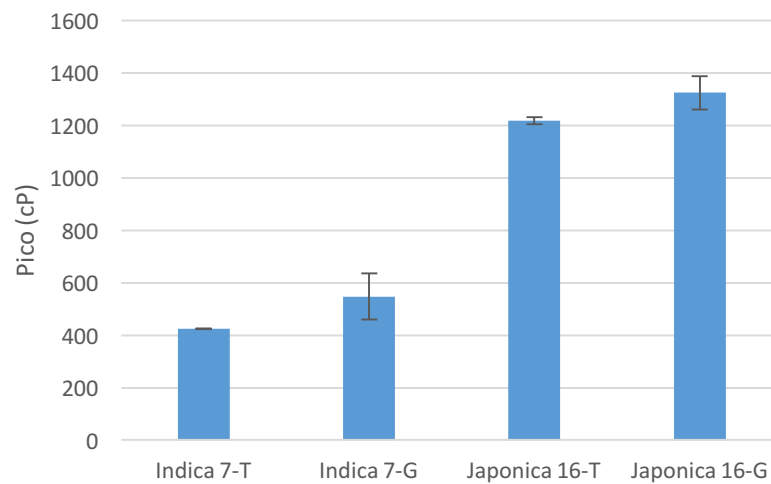


FIG. 34 Resultados pico da viscosidade das amostras, obtido pelo RVA.

A vala indica o final da fase do teste que se encontrava na temperatura máxima. Inicia a fase em que há a diminuição da temperatura e a viscosidade torna a aumentar, causada pela retrogradação do amido [175].

A FIG. 35 representa os resultados obtidos para a vala das amostras.

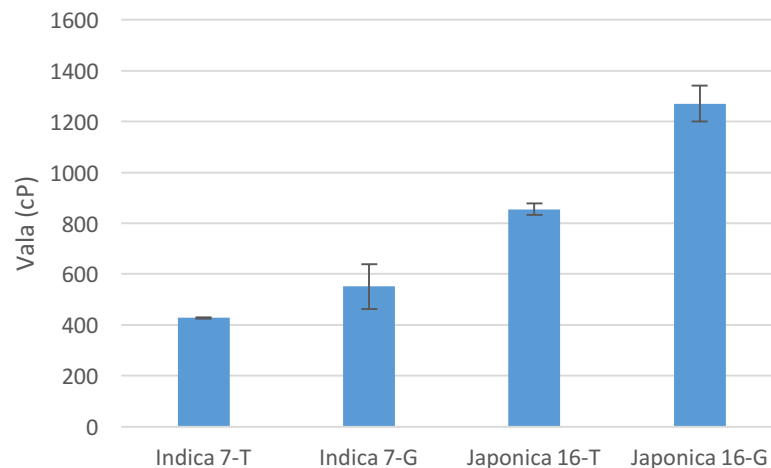


FIG. 35 Resultados da vala das amostras, obtido pelo RVA.

A viscosidade final atinge-se quando há a estabilização da viscosidade, relacionada com a capacidade do amido formar um gel viscoso após cozedura e arrefecimento [110].

Os valores da viscosidade final das amostras analisadas encontram-se representados na FIG. 36.

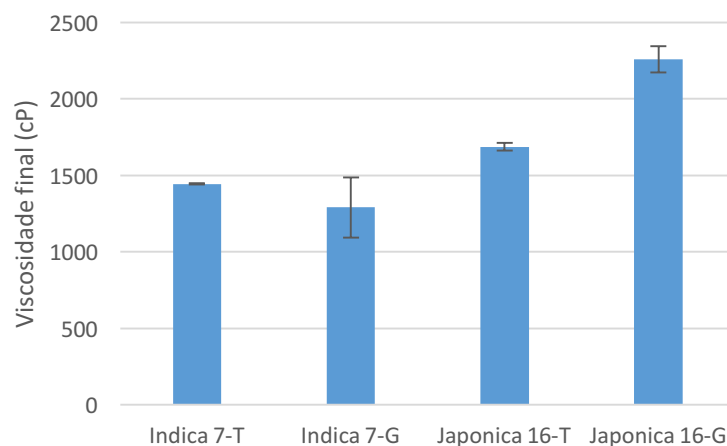


FIG. 36 Resultados viscosidade final das amostras, obtido pelo RVA.

Quando a viscosidade atinge o máximo ocorre uma quebra na viscosidade, que se denomina *breakdown*, como resultado da desintegração dos grânulos [110]. Durante esta fase as moléculas são dispersas pela solução [175].

A FIG. 37 representa os valores obtidos na análise do valor de *breakdown* das amostras.

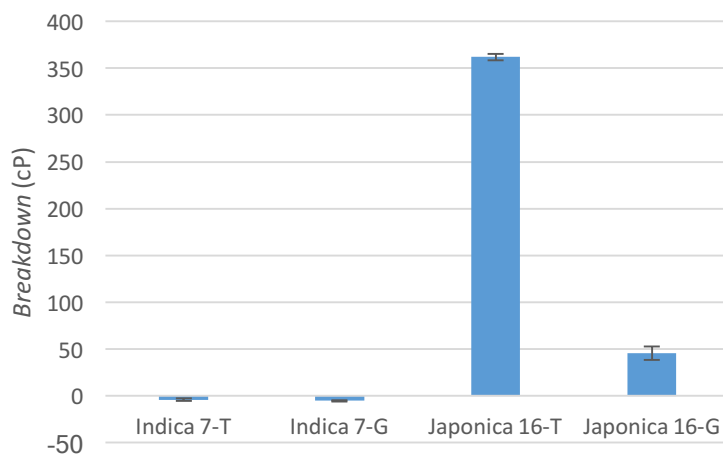


FIG. 37 Resultados breakdown das amostras, obtido pelo RVA.

A retrogradação é o aumento da viscosidade devido ao rearranjo das moléculas de amilose que foram libertadas dos grânulos de amido que absorveram água durante o arrefecimento [175].

A FIG. 38 representa os resultados obtidos da retrogradação das amostras.

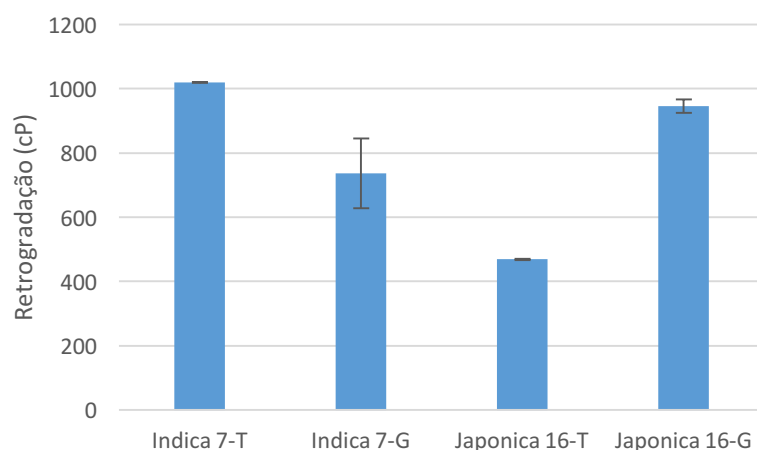


FIG. 38 Resultados da retrogradação das amostras, obtido pelo RVA.

A FIG. 39 representa os resultados obtidos no tempo em que se atinge o pico da viscosidade.

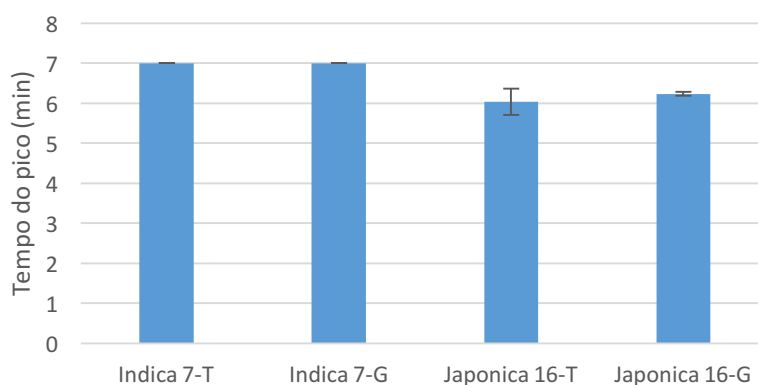


FIG. 39 Resultados tempo do pico das amostras, obtido pelo RVA.

A *pasting temperature* é a temperatura no qual a viscosidade atinge o seu máximo [110]. A viscosidade aumenta com o aquecimento contínuo até que os grânulos colapsem, neste nível é atingido o pico da viscosidade [110]. Este valor reflete a capacidade que o amido tem de se ligar à água o que se reflete na qualidade do amido do produto que está a ser analisado.

A FIG. 40 representa os resultados obtidos na *pasting temperature* nas diferentes amostras analisadas.

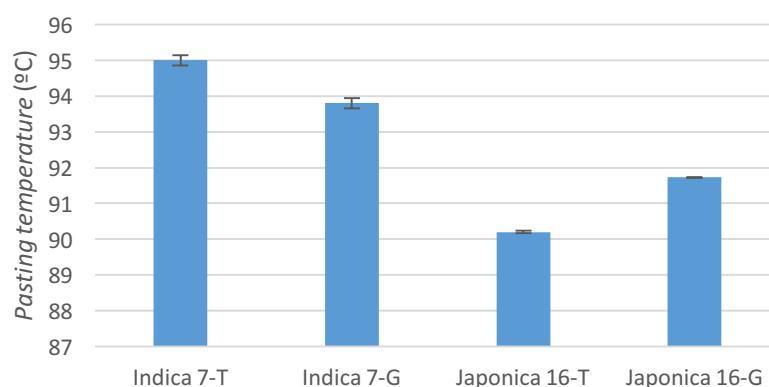


FIG. 40 Resultados da pasting temperature obtidos na análise das variedades por RVA.

Utilizando o programa RVA, reuniram-se as curvas de RVA das amostras. Estas curvas permitem verificar que há variação nos resultados do perfil de viscosidade do RVA tanto nas variedades testemunho como germinadas, que se podem observar na FIG. 41. As variedades controlo e germinadas são constituídas por um controlo *indica* e o seu respetivo germinado, e um controlo *japonica* e o seu respetivo germinado. Pode-se constatar uma diferença no perfil de viscosidade entre cada tipo de variedade (FIG. 41). Além disso, também é possível observar uma alteração no perfil de viscosidade da amostra germinada em relação à sua amostra testemunho. As amostras germinadas atingem um perfil de viscosidade mais alto do que as testemunha.

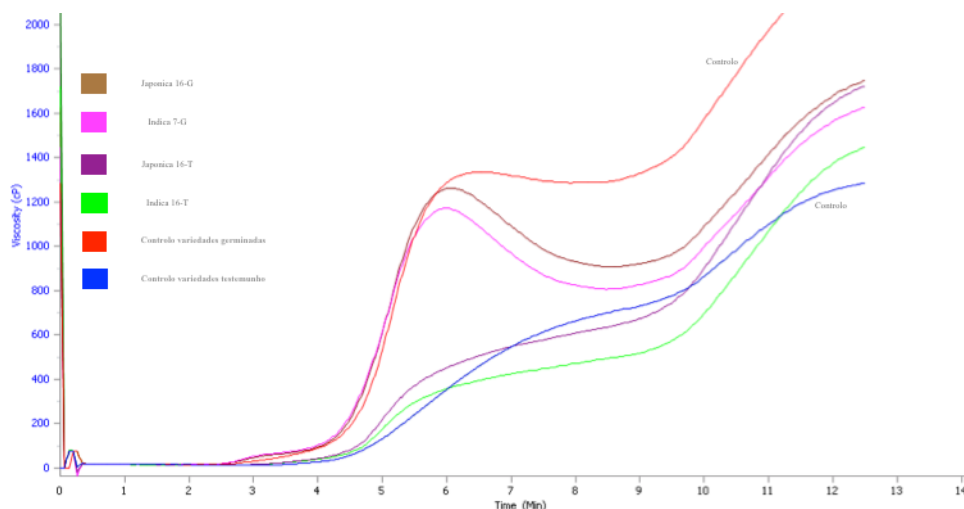


FIG. 41 Representação gráfica dos resultados obtidos no RVA das variedades controlo e germinadas.

As propriedades de viscosidade do amido são afetadas pelo conteúdo em amilose, lípidos e tamanho das cadeias de amilopectina. Se existirem pequenas variações nos conteúdos de

amilose não há mudanças no perfil de viscosidade [110]. O conteúdo em amilose inibe a absorção de água dos grânulos de amido ao formar complexos com lípidos, que resulta num valor de pico de viscosidade menor e numa maior *pasting temperature* [171]. O aumento na viscosidade com a temperatura pode estar atribuído à remoção de água da amilose dos grãos. A viscosidade final aumenta com o arrefecimento, devido à agregação das moléculas de amilose [110].

As variedades *indica* possuem menor viscosidade final que as variedades *japonica*. Além disso, nota-se uma tendência de reduzido valor de *breakdown* nas variedades *indica* e elevado valor de retrogradação nas variedades *japonica*. Estes valores são explicados pelo facto do *breakdown*, que é a diferença entre o pico máximo e o pico mínimo, atingir menor pico de viscosidade, ocorrendo menor diferença entre picos e, assim, menor *breakdown*. Atingindo menor pico também se mostra menos viscoso.

O tempo em que as variedades atingem o pico de viscosidade é superior nas *indica*. Ao demorarem um maior período de tempo a atingir o pico de viscosidade, já que este valor é inferior, é necessário um maior intervalo de tempo para que este seja atingido. O contrário ocorre nas variedades *japonica*.

A temperatura em que se atinge o pico de viscosidade é superior nas variedades *indica*, visto também demorar mais tempo a atingir o pico e o ciclo já se encontrar a temperaturas mais elevadas.

A vala, que é a viscosidade mínima atingida após o pico, apresenta valores elevados na variedade *japonica* que é a que apresenta viscosidade final superior. Assim, é também o que vai apresentar maior viscosidade mínima. As variedades testemunha são as que apresentam maior valor de vala, já que também apresentam baixo valor de viscosidade final.

O valor elevado da retrogradação é causado pela quantidade e peso das moléculas de amilose libertadas dos grânulos [110]. O valor de retrogradação é superior nas variedades *japonica*, visto ser a diferença entre a viscosidade final e o pico. Como tanto a viscosidade final como o pico da viscosidade obtidos são superiores nesta variedade, a diferença entre estes vai ser elevado e aí o valor de retrogradação vai ser superior. Isto explica-se com o facto de a variedade *japonica* possuir maior viscosidade final e atingir um elevado valor do pico de viscosidade, e por possuir mais amilopectina na sua constituição.

As variedades germinadas em relação às variedades testemunho demonstram que ocorre uma alteração no perfil de viscosidade obtido.

O pico da viscosidade obtido nas variedades germinadas é superior ao das variedades testemunha, do mesmo modo que a viscosidade final também é superior nas variedades germinadas. Deste modo, após a germinação as variedades tornam-se mais viscosas.

O valor da vala das variedades germinadas é superior às variedades testemunha. Assim a viscosidade mínima, após o pico, mais elevada é dos germinados.

O *breakdown* das variedades *japonica* germinadas diminui em relação às variedades testemunho, enquanto que a das *indica* aumenta. Isto é explicado pelas alterações que ocorrem nos valores do pico máximo e do pico mínimo destas variedades após a germinação.

As variedades *indica* possuem menor valor de retrogradação após a germinação, e o contrário ocorre nas variedades *japonica*. Estes valores são explicados pela diferença entre a viscosidade final e o pico, que apesar de aumentarem ambas as variedades após a germinação, continuam a possuir valores diferentes. Além disso, as variedades *japonica*, devido a possuírem um elevado conteúdo em amilopectina, têm maior facilidade em serem sujeitas a retrogradação. Por outro lado, as variedades *indica* possuem menos amilopectina na sua constituição, possuindo menos facilidade em serem sujeitas a retrogradação.

O tempo em que demora a ser atingido o pico é o mesmo nas variedades testemunho e germinadas *indica*, e sofre apenas um ligeiro aumento nas variedades testemunho e germinadas *japonica*. Estes valores podem ser explicados pelos valores de pico de viscosidade obtidos, que não levam à alteração do tempo que demora a ser atingido esse mesmo valor.

A temperatura com que o pico é atingido possui também pequenas alterações, tendo um ligeiro aumento nas variedades germinadas *japonica* e diminuição nas variedades germinadas *indica*. Estes valores são coerentes com o tempo que demora a ser atingido o pico, já que se demora o mesmo tempo a temperatura com que este for atingido será a mesma.

5.5. Amido total

O amido é o maior constituinte do arroz. O amido total engloba uma parte digerível, amilose e amilopectina, e não digerível, amido resistente [95].

A partir da análise das amostras obtiveram-se os resultados, em matéria seca, de amido

total (%) que podem ser observados na FIG. 42.

As amostras que apresentaram valores mais reduzidos foram *indica*. Estas possuem valores de 40.37% (Indica 7-G) e 59.14% (Indica 7-T).

As amostras com valores mais elevados de amido total foram *japonica*. Estes apresentam valores de 74.31% (Japonica 16-G) e 63.88% (Japonica 16-T).

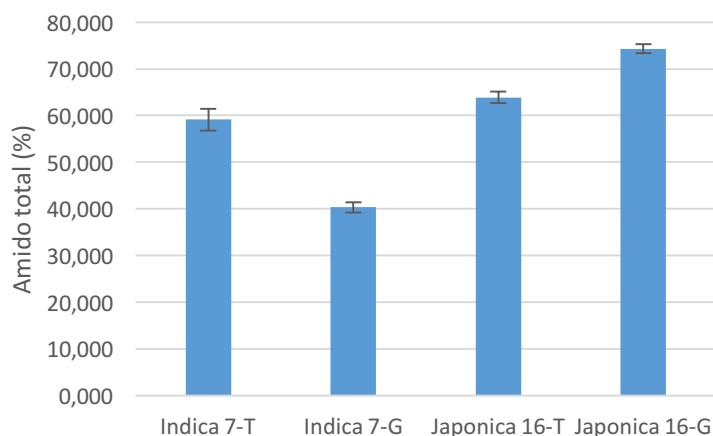


FIG. 42 Amido total (%), em matéria seca das amostras.

As amostras que foram sujeitas a uma hora de imersão em água voltaram a ser analisadas em relação ao conteúdo em amido total. Os resultados podem ser observados na FIG. 42.

O conteúdo em amido total foi mais reduzido em Japonica 16-G e Indica 7-T. Estas amostras possuem um valor de 57.989%, 67.644%, respetivamente.

As amostras que apresentaram maior conteúdo foram Indica 7-G e Japonica 16-T. Estas apresentaram valores de 75.467% e 72.082%, respetivamente.

As amostras sem e com imersão em água não apresentam resultados em comum. Existe uma variância nestes valores após serem sujeitos a uma hora de imersão, que se verifica como uma tendência de aumento do amido total, como se pode observar na FIG. 43.

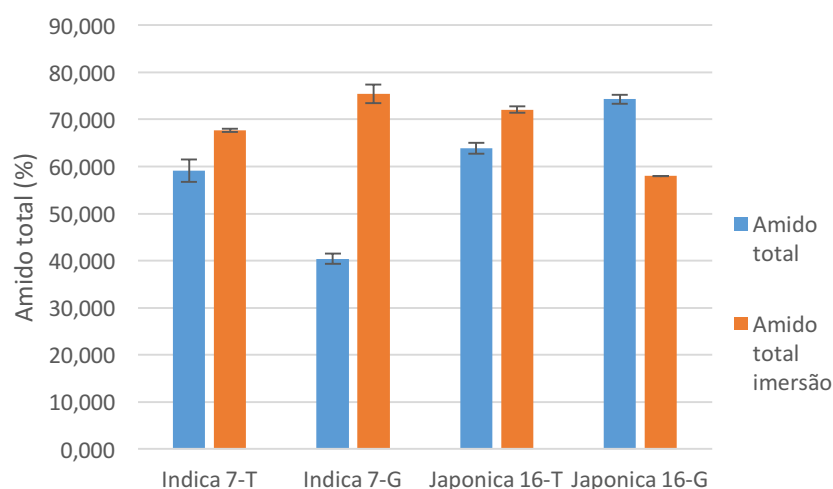


FIG. 43 Comparação do valor de amido total (%) das amostras, em matéria seca, sem e com uma hora de imersão.

O amido total das variedades *indica* é superior ao de *japonica*. Esta variação pode estar relacionada com o meio de cultura dos diferentes grãos ou condição de cultivo, visto os grãos de *Oryza sativa* possuírem, geralmente, cerca de 90% de amido total na sua constituição e as variâncias neste valor poderem ocorrer no seu desenvolvimento [9].

Após a imersão o amido total de *indica* apresenta valores superiores ao de *japonica*. Isto pode ser explicado pela capacidade que as variedades *indica* possuem de menor absorção de água, em comparação às variedades *japonica*, sofrendo menor degradação de amido [106].

As variedades testemunho *indica*, sem imersão, em relação às germinadas possuem maior valor de amido total. Após a germinação ocorre decomposição do amido, por α -amilase, que leva ao aumento de oligossacarídeos e aminoácidos, que são decompostos pela água e absorvidos. Após a imersão durante 1 hora, os valores de amido total, da variedade *indica* testemunho diminui em relação à variedade germinada. O facto de o conteúdo em amido total aumentar na variedade germinada com imersão, pode ser explicado por uma quantificação em excesso de glucose ao serem quantificados monómeros que não correspondem ao amido total.

As variedades testemunho *japonica*, sem imersão, em relação às germinadas possuem menor valor de amido total. Estes valores podem ser explicados pela perda de uma fração do grão, que poderia ser onde estava localizado o amido, já que a análise é realizada numa pequena amostra, e por uma quantificação por excesso nas variedades germinadas. Após a imersão durante 1 hora, o valor de amido total da variedade testemunha possui maior valor

do que a variedade germinada, o que são os valores expectáveis no final da germinação, em que ocorre decomposição de amido pela enzima α -amilase.

5.6. Amido resistente

O amido resistente possui um grande impacto na digestão do amido, aumentando as respostas tanto à insulina como à glicémia [95].

Tendo em conta que alimentos com maior amido resistente possuem menor concentração de energia, auxiliam a controlar o peso e o índice glicémico que é ingerido [99].

O conteúdo em amido resistente, em matéria seca, nas amostras analisadas está representado na FIG. 44.

As amostras que apresentaram um resultado mais reduzido de amido resistente foram as amostras *japonica*. Os valores foram de 8.301% (Japonica 16-T) e 9.313% (Japonica 16-G).

O conteúdo em amido resistente foi superior as amostras *indica*. Estas possuem conteúdo em amido resistente de 11.271% (Indica 7-T) e 10.004% (Indica 7-G).

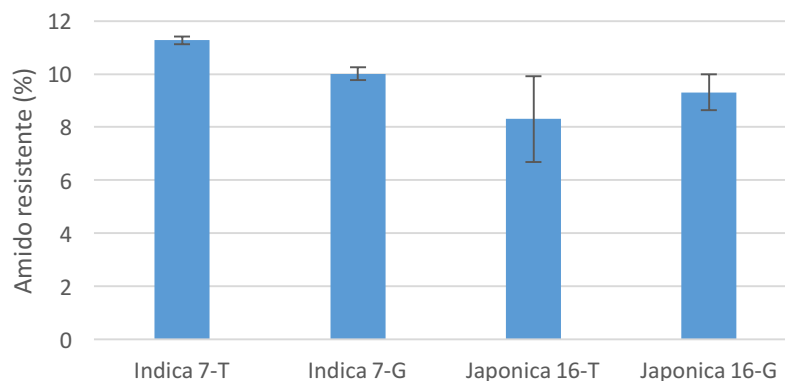


FIG. 44 Amido resistente (%), em matéria seca, das amostras.

O conteúdo em amido resistente, em matéria seca, após uma hora em imersão em água nas amostras analisadas, em comparação com o amido resistente sem imersão, está representado na FIG. 45.

As amostras que apresentaram um resultado mais reduzido de amido resistente foram as amostras testemunha. Os valores foram de 4.950% (Japonica 16-T) e 6.738% (Indica 7-T) respectivamente.

O conteúdo em amido resistente foi superior nas amostras germinadas. Estas possuem conteúdo em amido resistente de 7.784% (Japonica 16-G) e 7.018% (Indica 7-G).

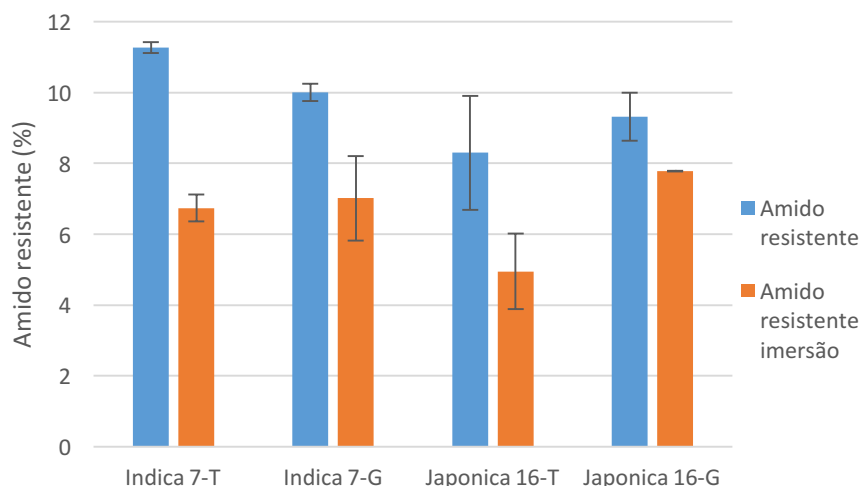


FIG. 45 Comparação valores amido resistente (%) das amostras, em matéria seca, sem e com uma hora de imersão.

Na FIG. 45 pode-se observar, por comparação entre valores obtidos sem imersão e com imersão, uma tendência para a diminuição do amido resistente.

O valor de amido resistente é inferior nas variedades *indica*, em comparação com as variedades *japonica*.

O valor de amido resistente na variedade *japonica* obtido após a germinação é superior ao obtido na testemunha. O valor de amido resistente na variedade *indica* obtido após a germinação é inferior, em comparação com o valor obtido nas variedades testemunha. Estes valores significam que após a germinação ocorre uma alteração no conteúdo de amido resistente devido à degradação de amido por parte das enzimas.

Após a imersão a tendência mantém-se e as variedades *indica* possuem menor amido resistente. Além disso, após imersão, há uma diminuição do valor de amido resistente de todas as amostras, em comparação com o valor obtido sem imersão [145]. Estes valores indicam que pode ocorrer degradação de amido no processo de germinação pela ação das enzimas presentes.

5.7. Amilose

O conteúdo em amilose está diretamente relacionado com a presença de amido e a textura do arroz cozinhado, sendo uma característica com bastante importância para caracterizar uma variedade de arroz [176].

Tendo em conta o conteúdo em amilose os grãos podem ser classificados como waxy (1-2% amilose), conteúdo muito reduzido (2-12%), conteúdo reduzido (12%-20%), conteúdo intermédio (20 -25%) e conteúdo elevado (25-33%) [177]. A hidrólise do amido é mais completa e rápida para grãos de arroz waxy e com conteúdo em amido reduzido. Em comparação os grãos com conteúdo em amilose intermédio e elevado possuem um processo mais longo na decomposição do amido [144].

Grãos de arroz com uma grande concentração de amilose atrasam a digestão e/ ou absorção de hidratos de carbono [178]. A amilose ao formar uma estrutura que limita o acesso das enzimas e degradação do amido em açúcar afeta a resposta glicémica [179]. Assim, variedades com esta característica são utilizadas por consumidores que desejam alimentos com baixo índice glicémico [154].

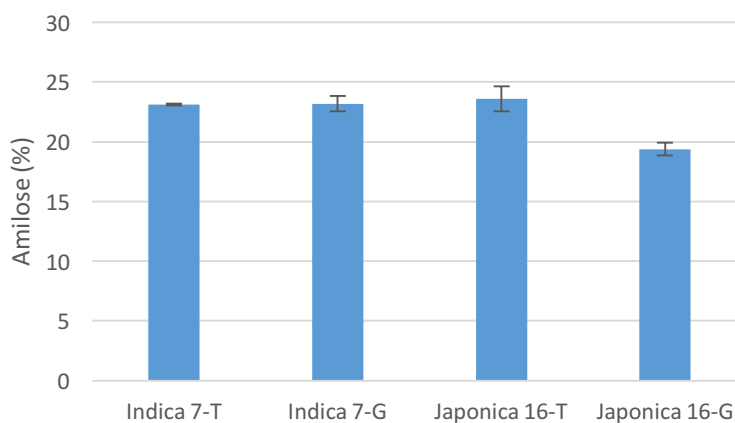


FIG. 46 Conteúdo em amilose (%), em matéria seca, das amostras.

A FIG. 46 representa os resultados obtidos em conteúdo de amilose (%), em matéria seca, nas 4 amostras analisadas.

As amostras que apresentaram um menor conteúdo em amilose foram as amostras germinadas. Estas têm valores de 19.371% (Japonica 16-G) e 23.100% (Indica 16-G).

As amostras que apresentaram um maior conteúdo em amilose foram as amostras testemunho. Estas têm valores de 23.602% (Japonica 16-T) e 23.185% (Indica 7-T).

Após uma hora de imersão as amostras tiveram o conteúdo de amilose verificado. A análise gráfica dos valores obtidos encontra-se representada na FIG. 47.

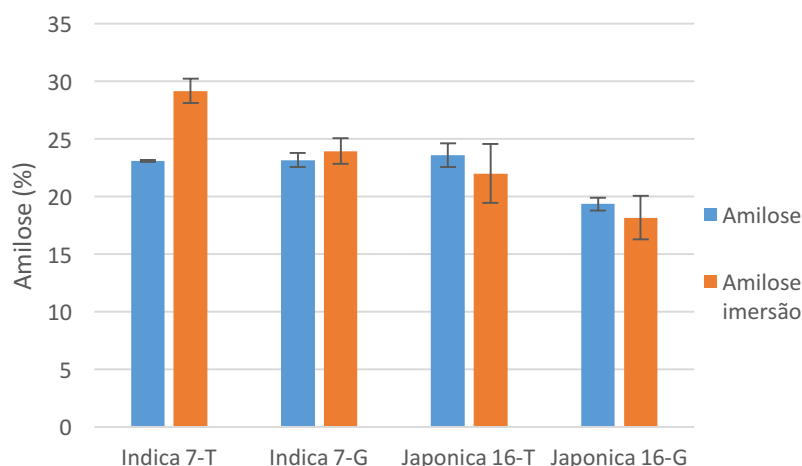


FIG. 47 Comparação conteúdo amilose (%) das amostras, sem e com imersão após uma hora.

O conteúdo em amilose foi inferior nas amostras *japonica* e, com valores de 18.180% (Japonica 16-G) e 22.014% (Japonica 16-T).

Os resultados, em relação ao conteúdo de amilose após imersão, foram superiores nas amostras *indica*. Estas apresentaram valores de 29.188% (Indica 7-T) e 23.941% (Indica 7-G).

As amostras analisadas nas duas variantes (sem e com imersão em água), demonstraram uma diminuição no conteúdo de amilose após a hora de imersão em água.

Com os valores obtidos pode-se categorizar as variedades, tendo em conta o conteúdo em amilose, em ceroso (0-2%), muito baixo (2-12%), baixo (12-20%), intermediário (20-25%) e alto (25-33%) [7].

Não houve nenhuma variedade com teor em amilose entre 0 e 2%, não havendo assim nenhuma caracterizada como cerosa.

A variedade caracterizada como tendo conteúdo em amilose baixo foi Japonica 16-G. Após imersão, a variedade caracterizada como tendo conteúdo em amilose baixo foi Japonica 16-G.

As variedades caracterizadas como tendo conteúdo em amilose intermediário foram Indica 7-T, Indica 7-G e Japonica 16-T. Após imersão, as variedades caracterizadas como tendo conteúdo em amilose intermediário foram Japonica 16-T e Indica 7-G.

Após imersão, a variedade caracterizada como tendo conteúdo em amilose alto foi Indica 7-T.

O conteúdo em amilose é inferior nas variedades *japonica*, em comparação com as *indica*. Nas variedades em imersão, também as *japonica* possuem valores inferiores de amilose. A variedade *indica* possui maior amilose já que esta variedade é assim constituída e por isso tem menor capacidade de absorção de água.

A variedade testemunha *indica* possui uma diminuição no teor de amilose, em comparação com a variedade germinada. A variedade testemunho *japonica* possui conteúdo em amilose ligeiramente superior ao germinado. Esta variação de valores é explicada pelo processo de germinação, no qual os grãos estão em imersão e em que pode variar a absorção de água por parte do grão e no final a proporção de compostos. O facto da amilose ser um constituinte do amido, e de este diminuir, leva a que ocorra uma diminuição da mesma.

Após a imersão ocorre aumento no teor de amilose, em *indica*. Na variedade *japonica* ocorre uma diminuição no conteúdo de amilose. O facto de a amilose diminuir na variedade *japonica* deve-se ao facto de ter saído para a água, já que esta variedade não tem grande capacidade de absorção de água. Por outro lado, o aumento em *indica* ocorre devido a uma quantificação por excesso de glucose, em que é quantificado um monómero que não corresponde à amilose.

5.8. Índice glicémico

O arroz é um alimento com valor de índice glicémico elevado. Há cada vez mais uma procura de alimentos com baixo valor do mesmo, devido a doenças como diabetes tipo 2 [180]. Os alimentos com baixo índice glicémico libertam pouca glucose [181]. Tendo isto em conta, é de elevada importância para a Novarroz que seja analisado o índice glicémico das amostras e que se indique qual a variedade que possui um valor mais reduzido.

Os resultados da análise efetuada às quatro amostras estão representados no gráfico da FIG. 48.

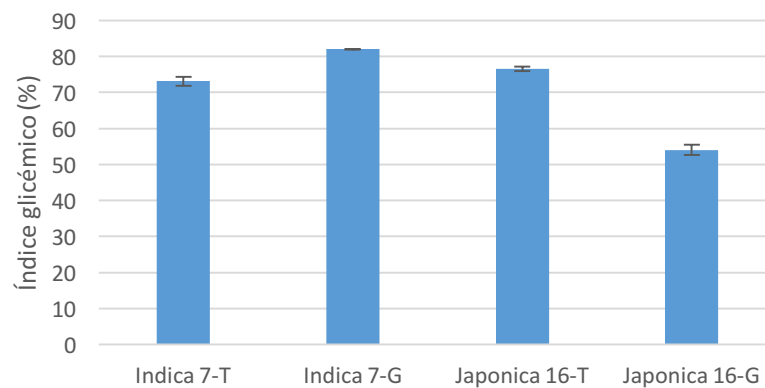


FIG. 48 Índice glicémico das amostras.

As variedades que apresentaram um menor índice glicémico foram Japonica 16-G e Indica 7-T. Estas possuem valores de 54.07% e 73.17%, respetivamente.

As variedades que apresentaram um maior índice glicémico foram Indica 7-G e Japonica 16-T. Estas possuem valores de 82.04% e 76.55%, respetivamente.

As variedades foram sujeitas a imersão em água durante uma hora e este teste foi realizado para verificar a existência da diminuição do índice glicémico das amostras, tal como já foi verificado noutros estudos, noutras variedades de cereais [182]. Na FIG. 49 podem-se observar os resultados que foram obtidos com a realização destes testes.

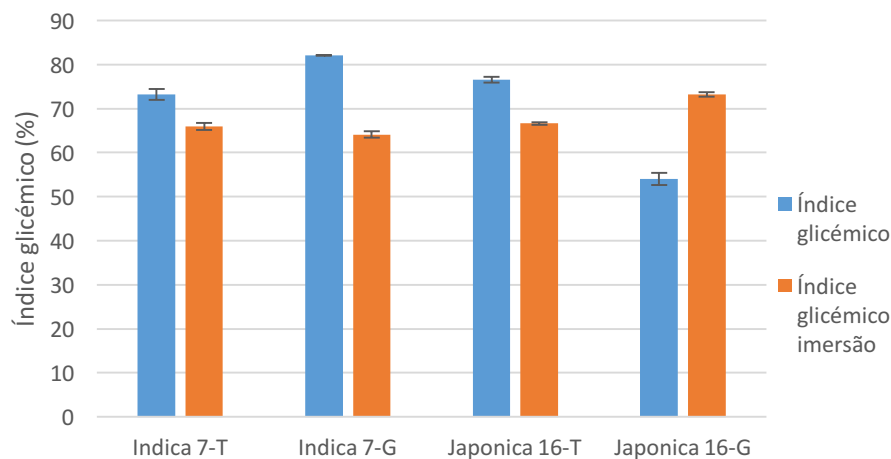


FIG. 49 Comparação dos valores das amostras entre o índice glicémico e o índice glicémico após uma hora de imersão.

As amostras que apresentaram menor índice glicémico foram as amostras *indica*. Estas possuem valores de 64.11% (Indica 7-G) e 65.89% (Indica 7-T)

As amostras que apresentaram maior índice glicémico foram as amostras *japonica*. Estas possuem valores de 73.22% (Japonica 16-G) e 66.63% (Japonica 16-T).

Verifica-se uma diminuição no IG após a imersão em todas as variedades, exceto em Japonica 16-G.

A análise ao valor do índice glicémico de *Oryza sativa* demonstrou que este varia de 54.07 a 82.04%. Deste modo, as variedades são caracterizadas como baixo e alto IG.

Após uma hora de imersão, os valores de IG possuem tendência a diminuir, exceto Japonica 16-G. Esta alteração pode ser explicada pelo aumento da humidade do grão e diminuição do amido total, que são valores utilizados para se calcular o IG [143].

As variedades *indica* são as que apresentam maior IG, seguidas de *japonica*. Após imersão as variedades *japonica* são as que apresentam maior IG. As variedades são suscetíveis à imersão em água, e alteração de humidade e amido total. No entanto, deve ser referido que todas as variedades sofrem uma diminuição do valor de IG quando são sujeitas a imersão, com exceção de Japonica 16-G. O facto da variedade Indica 7-T, após imersão, ter IG superior à variedade germinada, deve-se ao facto de as variedades com maior teor de GABA possuírem menor IG, o que ocorre nas germinadas [121].

As variedades testemunha *japonica* possuem maior IG do que as variedades germinadas, o que não ocorre na variedade *indica*. Esta diminuição do IG das variedades germinadas em relação às variedades testemunha, é devida ao processo de germinação que as coloca na presença de água e dos ácidos orgânicos que podem ser produzidos e que reduzem a glicémia ou diminuem a taxa de digestão [147]. Além disso, as variedades com maior conteúdo em GABA possuem menor IG, o que é o caso das germinadas [121]. O facto da variedade testemunho *indica* possuir um aumento deve-se à diminuição do conteúdo em amido total nesta amostra. De referir que as análises são realizadas em apenas dois grãos de *Oryza sativa*, o que aumenta a variabilidade destes resultados, pois o grão analisado pode possuir algum dano na zona onde o amido se encontra localizado.

A realização da germinação leva a que se obtenha uma variedade de *Oryza sativa* com baixo IG, Japonica 16-G com valor de 54.07%. Esta diminuição, em comparação com a variedade testemunho deve-se a um aumento no teor de fibras e nutrientes que levam a que os hidratos de carbono sejam lentamente decompostos e libertado um nível de glucose baixo para a corrente sanguínea [117].

Após imersão, tanto as variedades testemunho como germinadas possuem uma diminuição no valor de IG, com exceção de Japonica 16-G. Com esta diminuição

conseguiram-se obter valores de IG intermédio. A exceção deve-se mais uma vez ao valor de amido total reduzido que a amostra possui após a imersão.

5.9. Germinação

Após a germinação obtém-se um grão de arroz com maior volume e com menos película, como se pode observar na comparação entre a FIG. 50 A (antes da germinação), e a FIG. 50 B (após a germinação) e FIG. 51 A (antes da germinação), e a FIG. 51 B (após a germinação).

Nos grãos de arroz germinados não se verifica nenhum odor, nem alteração da cor do mesmo.



FIG. 50 Grão de arroz indica antes da germinação (A) e após a germinação (B).

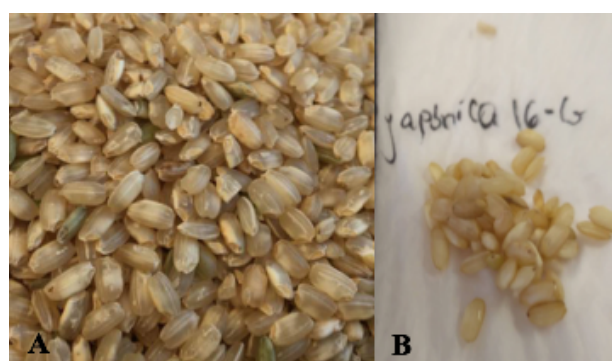


FIG. 51 Grão de arroz japonica antes da germinação (A) e após a germinação (B).

A análise realizada às amostras germinadas demonstra um aumento no valor da humidade explicada pela absorção de água que ocorre durante o processo de germinação.

Além disso também se observa um aumento no valor de *kett* devido à perda de película por forças abrasivas, tornando a amostra mais branqueada e diminuindo também a relação comprimento-largura.

O facto de não ocorrer alteração de cor nem apresentação odor demonstra que não ocorreu fermentação e assim não houve proliferação significativa de microrganismos.

5.10. Identificação microrganismos na germinação

A presença de microrganismos nas variedades é analisada e tem valores de controlo para que o consumidor esteja em segurança aquando o consumo do produto [16].

Tabela 10 Valores de microrganismos controlo e presentes nas análises sem imersão, com imersão durante uma hora e após germinação.

	Valores controlo (UFC/g)	Sem imersão (UFC/ g)	Imersão 1 hora (UFC/ g)	Germinação (UFC/ g)
Quantificação de Microrganismos a 30°C	1.0×10^6	1.0×44^2	1.0×54^3	$>1.0 \times 49^5$
Quantificação de Enterobacteriaceae	1.0×10^5	$<1.0 \times 10^1$	1.0×83^2	$>1.0 \times 49^4$
Quantificação de <i>Escherichia coli</i>	1.0×10^2	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^1$
Quantificação de <i>Bacillus cereus</i>	1.0×10^2	$<1.0 \times 50^1$	$<1.0 \times 50^1$	$<1.0 \times 50^1$
Quantificação de Bolores	1.0×10^4	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^1$
Quantificação de Leveduras	1.0×10^4	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^1$
Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	Ausente em 25g	0	0	0

A análise de microrganismos nas amostras com o valor que serve como controlo verifica que estão todas dentro destes parâmetros, o que se pode verificar na Tabela 10. Existem 1.0×44^2 UFC/g de microrganismos a 30 °C, dentro do limite de 1.0×10^6 UFC/g. Enterobacteriaceae tem como limite 1.0×10^5 UFC/g e foram detetados 1.0×10^1 UFC/g. *E. coli* tem como limite 1.0×10^2 UFC/g e foram detetadas 1.0×10^1 UFC/g. *B. cereus* tem como

A análise de microrganismos após uma hora de imersão continua dentro dos valores de controlo, como se pode observar na Tabela 10. Existem 1.0×10^3 UFC/g de microrganismos a 30 °C, dentro dos 1.0×10^6 UFC/g permitidos. Enterobacteriaceae tem como limite 1.0×10^5 UFC/g e foram detetados 1.0×10^3 UFC/g. *E. coli* tem como limite 1.0×10^2 UFC/g e foram detetadas 1.0×10^1 UFC/g. *B. cereus* tem como limite 1.0×10^2 UFC/g e foram detetados 1.0×10^1 UFC/g. Bolores e leveduras têm como limite 1.0×10^4 UFC/g e foram detetados 1.0×10^1 UFC/g de cada e *Salmonella* sp., continua ausente.

A análise de microrganismos após a germinação constata um aumento destes, que se pode observar na Tabela 10, em relação ao arroz sem imersão e com imersão de uma hora. Em relação aos valores que servem como controlo, os resultados obtidos continuam dentro do parâmetro permitido. Os microrganismos a 30 °C, que sem imersão têm uma presença de 1.0×10^2 UFC/g, aumentam para 1.0×10^5 UFC/g e as Enterobacteriaceae de 1.0×10^1 para 1.0×10^4 UFC/g. *E. coli*, *B. cereus*, bolores e leveduras mantiveram o mesmo valor de UFC/g, e *Salmonella* spp. continuou ausente.

O aumento verificado nos microrganismos após a imersão e germinação é explicado pelo aumento da humidade e aw do alimento. A prévia existência de microrganismos antes da imersão e o aumento de aw após esta, leva a que ocorra um aumento na suscetibilidade de proliferação de microrganismos, que se verifica nos resultados obtidos.

O aumento dos microrganismos a 30 °C aumenta a oportunidade de patogénicos se desenvolverem, já que estes são indicadores de qualidade. Na presença destes detetam-se odores desagradáveis e alteração de cor, gerada pelas substâncias que estes produzem [22].

Enterobacteriaceae possui um aumento elevado após imersão. Este aumento de valores é explicado, tal como nos microrganismos a 30 °C, pelo aumento de aw do arroz. Quanto maior a aw, maior será a proliferação dos microrganismos, que se verifica quando aw é superior a 0.95 no caso de Enterobacteriaceae [55].

E. coli, *B. cereus*, bolores e leveduras mantiveram os mesmos valores, não havendo proliferação destes microrganismos com uma hora de imersão ou após germinação. Isto pode ser explicado devido ao valor de aw não ter aumentado o suficiente para que aumentasse a proliferação [50].

O facto de o arroz ser um alimento rico em amido, apresenta uma ligação com a proliferação de microrganismos. Um alimento rico neste composto leva a um aumento no consumidor, após a sua ingestão, em *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e butirato. A

proliferação destes microrganismos e seus substratos leva a que haja uma diminuição na proliferação de *E.coli* [107].

A presença de amido resistente está ligada a uma alteração da microbiota intestinal. Deste modo, o facto de não ocorrer a proliferação de microrganismos, como *E. coli*, após a imersão e a germinação pode ser explicada pelo elevado teor de amido resistente presente nestes grãos. Além disso, também garante a qualidade e potencial do produto alimentar ao poder incrementar o conteúdo de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* na microbiota intestinal, após a ingestão deste alimento [105].

Salmonella está ausente sem imersão, numa hora de imersão e após a germinação, não sendo o meio nem o valor de a_w o necessário para o seu desenvolvimento [60].

5.11. Quantificação GABA

Através da observação do espectro obtido por FTIR verificaram-se alterações em *Oryza sativa* tanto em comparação de película, sem e com imersão, como em comparação com germinado, sem e com imersão.

O espectro do arroz germinado comparado com o seu testemunho demonstra uma maior saída de amido. Além disso, também se verifica um aumento do pico na zona do espectro onde se visualiza GABA no arroz germinado, em comparação com o arroz testemunho.

A análise do espectro em relação à absorção de água demonstra um aumento no pico relativo à água após a imersão, verificando um aumento de a_w de *Oryza sativa*.

Através da análise da água em que *Oryza sativa* esteve em imersão demonstra-se a existência de gordura e proteínas, verificando-se a saída dos mesmos aquando a imersão durante uma hora.

Após a quantificação de GABA (mg/kg) por IC-UV/VIS, verificou-se um aumento nas variedades germinadas em comparação com as variedades testemunho. Estes valores podem ser observados na FIG. 52.

A amostra Indica 7-T tem quantificado 0.050 mg/kg e a variedade germinada tem 0.084 mg/kg. A amostra Japonica 16-T tem quantificado 0.050 mg/kg e a variedade germinada tem 0.100 mg/kg.

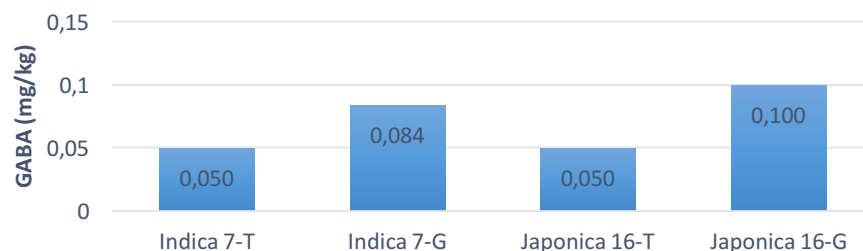


FIG. 52 Representação da quantidade de GABA (mg/kg) obtida nas variedades testemunho (Indica 7-T e Japonica 16-T) e nas variedades germinadas (Indica 7-G e Japonica 16-G).

As análises do espectro obtido por FTIR demonstram que o arroz germinado perde proteínas e gordura, que ficam na água em que é colocado durante a germinação. Além disso, o seu a_w também aumenta, visto que por análise de FTIR verifica-se o aumento no conteúdo de água do grão após a imersão em água.

As análises realizadas, por IC-UV/VIS, para quantificação de GABA nas variedades testemunho e germinadas demonstram que ocorre um aumento deste aminoácido após a germinação. Estes valores são concordantes com os dados observados nos espectros obtidos por FTIR.

As condições de *stress* às quais o grão é sujeito durante o processo de germinação levam a que ocorra a descarboxilação de L-glutamato pela enzima GAD, que é ativada no germen [117]. Além disso, estas condições também levam à degradação da camada integral do grão, daí que estes se apresentam no final da germinação com menor película.

As duas variedades testemunha possuem a mesma quantidade de GABA. No entanto, a variedade *japonica* germinada possui um maior aumento de GABA comparada com a variedade *indica* germinada. Esta diferença pode ser explicada pelo índice glicémico da variedade *japonica* ser inferior ao da variedade *indica*, e quanto menor o IG maior quantidade de GABA terá o grão [121]. Tendo em conta que após imersão o IG diminui e as condições de germinação incluem imersão, o GABA da variedade *japonica* germinada tem maior possibilidade de ter o seu conteúdo aumentado. Os valores atingidos de GABA correspondem quase à totalidade que o grão de arroz integral pode ter na sua constituição, que é de 0.01 a 0.12 mg/kg [131].

O facto de a germinação ocorrer em condições nas quais há elevado a_w e o processo durar algumas horas, faz com que haja uma proliferação elevada de microrganismos. A sua

presença favorece o aumento do conteúdo em GABA, devido ao grão ser sujeito a *stress* nestas condições e a existir a presença de microrganismos LAB que têm a característica dos produtos produzidos por estes possuírem GABA. Além disso, a presença de fungos, produtores de bolores, que produzem ou induzem o incremento de GABA, também influenciam o aumento do seu teor final [126].

Tanto antes como após o período de germinação, verifica-se a existência de bolores, produzidos por fungos e leveduras. Não se constata um incremento dos mesmos com o aumento do período de tempo em que ocorre a germinação, mas a sua presença é essencial para que ocorra o incremento em GABA, já que estes têm como propriedade o aumento ou mesmo produção deste aminoácido [126].

A conjugação de fatores como a presença de fungos e das condições ideais para a ativação da enzima GAD com o aumento da produção de GABA indica que são estes fatores que induzem o incremento no conteúdo de GABA.

O aumento no conteúdo em GABA nas variedades germinadas em comparação com as variedades testemunho, pode ser observado tanto nos espectros obtidos pelas análises realizadas por FTIR, que nos fornecem uma análise qualitativa, como por análises externas requisitadas pela empresa, que nos fornecem uma análise quantitativa.

6. Conclusão

Conseguiu-se a caracterização física, química e microbiana das variedades testemunho e germinadas.

A análise física permitiu caracterizar as variedades no seu comprimento, largura e brancura. As variedades *indica* demonstraram uma maior relação comprimento-largura do que *japonica*, havendo uma correlação negativa entre estes dois parâmetros ($r = -0.9922521$). A % de área gessada verificou-se ser maior em *japonica*, havendo uma correlação positiva entre este parâmetro e a brancura total ($r = 0.9516332$), brancura vítrea ($r = 0.8301895$) e *kett* ($r = 0.8750979$).

A análise ao perfil de viscosidade permitiu inferir que *indica* possui menor viscosidade final, pico de viscosidade e *breakdown* que *japonica*. Por outro lado, as variedades *japonica* apresentam elevado valor de retrogradação. Deste modo, os parâmetros *breakdown* e retrogradação apresentam uma correlação negativa ($r = -0.8484669$).

Os valores de amido das variedades variaram antes da imersão e após a mesma. Tanto as variedades *japonica* como *indica* apresentam menor conteúdo em amido total sem imersão e maior após imersão, exceto em Japonica 16-G.

No caso do amido resistente, os valores mais elevados encontram-se antes da imersão. Além disso, as variedades germinadas possuem menos conteúdo em amido resistente que as testemunha.

No caso da amilose as variedades germinadas possuem um menor teor que as testemunho. Após imersão, as variedades *indica* possuem um maior teor de amilose, e as *japonica* possuem um teor inferior.

Os resultados de índice glicémico das diferentes variedades foram maiores quanto maior foi a velocidade da sua hidrólise. Foi obtida uma variedade com baixo IG, Japonica 16-G, com o valor de 54.07%, que é uma amostra germinada sem imersão, e as restantes com alto IG, sendo o valor mais elevado 82.04% correspondente a Indica 7-G. Após imersão, obteve-se uma redução do IG das variedades, exceto em Japonica 16-G, com IG intermédio e alto, sendo o valor mais baixo 64.11% e o mais alto 73.22%. Desta forma, com o processo de germinação foi possível obter um valor de IG mais reduzido que os restantes, atingindo-se o objetivo da investigação de alcançar uma variedade com baixo IG.

O processo de germinação levou à alteração da composição dos grãos de arroz analisados. Ocorreu um incremento no conteúdo de GABA após a germinação, tanto na variedade *japonica*, de 0.050 a 0.100 mg/kg, como na variedade *indica*, de 0.050 a 0.084 mg/kg. Além disso, este processo também levou à diminuição do valor de índice glicémico das variedades. O facto das análises efetuadas na Universidade de Aveiro e as realizadas num laboratório externo afirmarem que ocorre o aumento no teor de GABA, demonstra que realmente após a germinação é obtido arroz com as características pretendidas. Deste modo, o objetivo de se conseguir uma variedade com maior teor em GABA, e que ao mesmo tempo tivesse baixo IG, foi também foi cumprido.

A análise microbiana realizada demonstrou que os valores obtidos estão dentro das especificações internas da empresa. Além disso, verifica-se que ocorreu uma pequena proliferação após imersão e germinação de microrganismos a 30 °C e Enterobacteriaceae, e nenhuma proliferação de *E. coli*, *B. cereus*, leveduras e bolores e *Salmonella sp.*, que se verificou ausente. Assim, verifica-se que os alimentos continuam próprios para consumo mesmo após todos estes procedimentos.

A existência de fungos permitiu concluir que a sua atividade, juntamente com as condições de germinação, leva a que as variedades germinadas possuam um incremento no conteúdo de GABA.

Como trabalhos futuros acredito que a realização de análises a uma quantidade superior de amostras permitiria uma melhor compreensão sobre os dados obtidos de *Oryza sativa* após a germinação, visto que se verificou um produto com bastante potencial. Conjuntamente sugiro a realização de secagem após germinação e a verificação da alteração no teor em GABA após este procedimento. Além disso, uma investigação mais aprofundada relacionada com o produto germinado, o seu teor em amido e a influência direta na microbiota intestinal de indivíduos com diabetes fornecerá uma maior compreensão sobre o produto germinado e o seu resultado em diabéticos.

7. Bibliografia

- [1] Novarroz, “*Quem somos.*” [Online]. Available: <http://www.novarroz.pt/pt/quem-somos>. [Accessed: 01-Apr-2017].
- [2] B. O. Juliano, “*Rice chemistry and technology,*” in *The American Association of Cereal Chemists*, 2nd ed., St. Paul, Minnesota, 1994.
- [3] S.-T. L. Dong-Hwa Cho, “*Germinated brown rice and its bio-functional compounds,*” *Food Chem.*, vol. 196, pp. 259–271, 2016.
- [4] FAO, “*Rice exports by the five major exporters,*” 2016. .
- [5] INE, “*Consumo humano de arroz branqueado e semibranqueado per capita (kg/ hab.) por comprimento do grão; Anual - INE, balanços de aprovisionamento de produtos vegetais.,*” 2016. [Online]. Available: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000186&contexto=bd&selTab=tab2. [Accessed: 09-Oct-2016].
- [6] K. GS, “*Origin, dispersal, cultivation and variation of rice.,*” *Plant Mol Biol.*, vol. 35, no. 1–2, pp. 25–34, 1997.
- [7] B. O. Juliano, *Rice in human nutrition*, vol. 53, no. 9. 1993.
- [8] H. I. Oka, “*Origin of cultivated rice.,*” *Japan Sci. Soc. Press. Tokyo/Amsterdam.*, 1988.
- [9] D. B. Juliano, B. O. and Bechtel, “*The rice grain and its gross composition.,*” in *Rice: Chemistry and Technology*, 2nd ed., B. O. Juliano, Ed. St. Paul, MN.: Am. Assoc. Cereal Chem., 1985, pp. 17–57.
- [10] Diário República, “*93 – 19 de Abril de 2000,*” pp. 1689–1692, 2000.
- [11] L. A. Walter, M.; Marchezan, E.; de Avila, “*Arroz: composição e características nutricionais,*” *Cienc. Rural*, vol. 38, pp. 1184–1192, 2008.
- [12] T. I. P. Frechaut, “*Validação de metodologia para deteção de Bacillus cereus em arroz e produtos à base de cereais,*” Universidade Nova Lisboa, 2014.
- [13] M. Van Schothorst, “*Principles for the establishment of microbiological food safety objectives and related control measures.,*” *Food Control*, vol. 9, no. 6, p. 379–384., 1998.
- [14] et al. van Schothorst, M., “*Relating microbiological criteria to food safety objectives and performance objectives.,*” *Food Control*, vol. 20, no. 11, p. 967–979., 2009.
- [15] NSWFA, “*Microbiological quality guide for ready-to-eat foods.,*” *A Guid. to Interpret. Microbiol. results.*, 2009.
- [16] C. Sousa, “*Laboratórios de microbiologia alimentar: os desafios actuais e futuros .,*” Universidade de Lisboa, 2012.
- [17] H. Coelho, T., Lima, H., Ferreira, “*Microrganismos indicadores em alimentos de origem animal,*” Universidade Federal Rural do Semiárido, 2014.
- [18] I. (International C. O. Microbiological and S. F. Foods), “*Técnicas de análise microbiológico.,*” in

- Microorganismos de los alimentos.*, Acribia., Zaragoza, 1994, p. 804.
- [19] C. de M. Alcantara, Marcela de; Morais, Isabela Cristina Lobo de; Souza, “Principal Microorganisms involved in the decay of sensory characteristics of meat products.,” *Rev. Bras. Hig. e Sanidade Anim.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–20, 2012.
- [20] J. B. R. Slifko, T.R., H.V. Smith, “Emerging parasite zoonoses associated with water and food.,” *Int. J. Parasitol.*, vol. 30, no. 13, pp. 1379–1392, 2000.
- [21] S. Viegas, “Alterações do Estado de Saúde Associadas à Alimentação: Contaminação microbiológica dos Alimentos,” Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2009.
- [22] J. I. S. Mendes, “Qualidade nutricional e microbiológica de enchidos.,” Instituto Politécnico de Bragança, 2013.
- [23] “Regulamento (CE) N.º 1831/2003 Da Comissão de 19 de Dezembro de 2003 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios,” *J. Of. da União Eur.*, pp. 364–388, 2006.
- [24] T. Filipe and A. Louro, “Populações de insetos numa fábrica de arroz e milho . Competição interespecífica como fator regulador,” 2015.
- [25] F. das C. O. Freire, I. G. P. Vieira, M. I. F. Guedes, and Francisca Noélia Pereira Mendes, “Micotoxinas: Importância na alimentação e saúde humana,” *Embrapa Agroindústria Trop.*, vol. 110, no. 1, pp. 1677–1915, 2007.
- [26] V. Betina, *Mycotoxins: production, isolation, separation, and purification*. Amesterdão, 1984.
- [27] A. Soares, C. Abrunhosa, L. Venâncio, “Fungos produtores de micotoxinas,” *Port. Soc. Microbiol. Mag.*, 2013.
- [28] N. Magan, “Mycotoxin contamination of food in Europe: Early detection and prevention strategies.,” *Mycopathologia*, vol. 162, pp. 245–253, 2006.
- [29] S. Raisuddin, “Toxic responses to aflatoxins in a developing host.,” *J. Toxicol. Toxin Rev.*, vol. 12, pp. 175–201, 1993.
- [30] M. O. Moss, “Mycotoxin review – 1. *Aspergillus* and *Penicillium*.,” *Mycologist*, vol. 16, pp. 116–119, 2002.
- [31] B. W. Horn, “Colonization of wounded peanut seeds by soil fungi: selectivity for species from *Aspergillus* section *Flavi*.,” *Mycologia*, vol. 97, pp. 202–217, 2005.
- [32] M. A. Klich, “Relation of plant water potential at flowering to subsequent cottonseed infection by *Aspergillus flavus*.,” *Phytopathology*, vol. 77, pp. 739–741, 1987.
- [33] C. S. Stafford, M. E.; McLaughlin, “Trichodermin, a possible inhibitor of the termination process of protein synthesis.,” *J. Cell Physiol.*, vol. 82, pp. 121–124, 1973.
- [34] N. E. Bayman, P.; Baker, J. L.; Doster, M. A.; Michailides, T. J.; Mahoney, “Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*.,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 68, pp. 2326–2329, 2002.
- [35] J. Larsen, T. O.; Svendsen, A; Smedsgaard, “Biochemical characterization of ochratoxin A – producing strains of the genus *Penicillium*.,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 67, pp. 3630–3635, 2001.

- [36] J. D. Beardall, J. M.; Miller, “Disease in humans with mycotoxins as possible causes.,” in *Mycotoxins in grains: compounds other than aflatoxin.*, H. L. In: MILLER, J. D.; TRENHOLM, Ed. St. Paul: Eagen Press, 1994, pp. 487–539.
- [37] “Commission Regulation (EU) 2015/1006 of 25 June 2015 amending Regulation (EC) No 1831/2003 as regards maximum levels of inorganic arsenic in foodstuffs (Text with EEA relevance),” *Off. J. Eur. Union*, vol. 161, no. 14, 2015.
- [38] H. da S. Pereira, “Avaliação higiênico-sanitária de equipamentos e manipuladores de uma beneficiadora de arroz,” Universidade do Extremo Sul Catarinense.
- [39] S. J. Forsythe, *Microbiologia da Segurança Alimentar*. Porto Alegre, 2002.
- [40] J. Baptista, P. Saraiva, “Higiene Pessoal na Indústria Alimentar,” *Forvisão*, pp. 1–46, 2003.
- [41] C. A. Baat, “*Bacillus cereus*,” *Encyclopedia of Food Microbiol.* Academic Press, pp. 119–124, 1999.
- [42] R. J. Kramer, J.M. & Gilbert, “Foodborne bacterial pathogens,” M. P. Doyle, Ed. New York, 1989, pp. 21–64.
- [43] E. J. Bottone, “*Bacillus cereus*, a volatile human pathogen.,” *Clin. Microbiol.*, vol. 23, no. 2, pp. 382–98, 2010.
- [44] H. S. Gandra, E.A., Gandra, T.K.V., Mello, W.S. & GodoiI, “Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos,” *Acta Sci.*, vol. 30, no. 1, pp. 109–118, 2008.
- [45] M. Brun, Y. Bes, “*Staphylococcus*,” in *Précis de bactériologie clinique*, ESKA., Paris, 2000, pp. 783–834.
- [46] K. A. Komatsu, R. S., Rodrigues, M. A. M., Loreno, W. B. N., Santos, “Ocorrência de *Staphylococcus coagulase positiva* em queijo minas frescal produzido em Uberlândia-MG= Occurrence of *Staphylococcus coagulase positiva* in fresh minas cheese produced in Uberlândia-MG.,” *Biosci. J.*, vol. 26, no. 2, 2010.
- [47] D. Kinton, R.; Ceserani, V.; Foskett, *Enciclopédia de serviços de alimentação.*, Varela. São Paulo, 1999.
- [48] D. Biberstein, EL.; Jang, SS.; Hirsh, “Species distribution of coagulase-positive staphylococci in animals,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 19, pp. 610–615, 1984.
- [49] F. L. Hoffmann, “Fatores limitantes à proliferação de microorganismos em alimentos.,” *Bras. Aliment.*, vol. 9, no. 1, pp. 23–24, 2001.
- [50] M. B. O. C. De Santana, E. H. W., Beloti, V., Aragon-Alegro, L. C., de Mendonça, “*Estafilococos* em alimentos.,” *Arq. Inst. Biológico*, vol. 77, no. 3, pp. 545–554, 2010.
- [51] M. I. S. Germano, P. M. L.; Germano, *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos.*, Varela. São Paulo, 2001.
- [52] L. Jousson, O. Di Bello, D. Vanni, M. Cardini, G.; Soldani, G. Pretti, C.;Intorre, “Genotypic versus phenotypic identification of staphylococcal.,” *Vet. Microbiol.*, vol. 123, pp. 238–244, 2007.
- [53] M. L. R. S. Vasconcelos, N.G.; Cunha, “*Staphylococcal enterotoxins: Molecular aspects and detection methods.*,” *J. Public Heal. Epidemiol.*, vol. 2, no. 3, pp. 29–42, 2010.
- [54] S. Blaiotta, G.; Fusco, V.; Ercolini, D.; Pepe, O.; Coppola, “Diversity of *Staphylococcus Species*

- Strains Based on Partial kat (Catalase) Gene Sequences and Design of a PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Assay for Identification and Differentiation of Coagulase-Positive Species (S. aureus, S. delphini, S. ,” J. Clin. Microbiol., vol. 48, pp. 192–201, 2010.*
- [55] W. Cecília, M., Araújo, P., Carvalho, R., Rocha, “*Enterobactérias*,” Universidade Federal de Alagoas, 2013.
 - [56] R. A. Guimarães *et al.*, “*Caracterização filogenética molecular e resistência antimicrobiana de Escherichia coli isoladas de caprinos neonatos com diarreia*,” *Ciência Anim. Bras.*, vol. 16, no. 4, pp. 615–622, 2015.
 - [57] Q. Segurança Alimentar, “*Bactéria Patogénica - Escherichia coli*.” [Online]. Available: <http://www.quali.pt/microbiologia/478-escherichia-coli>. [Accessed: 02-May-2017].
 - [58] C. P. Pigatto, “*Caracterização fenotípica e genotípica de Escherichia coli produtora de toxinas SHIGA (STEC) isoladas de bovinos de corte do estado do Paraná*,” Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho,” 2008.
 - [59] C. Bell and A. Kyriakides, *Salmonella: A practical approach to the organism and its control in foods*. 2007.
 - [60] A. Bell, Chris. Kyriakides, *Salmonella: A practical approach to the organism and its control in foods*. 2002.
 - [61] *et al.* Eckner, K.F., Dustman, W.A., Curiale, M.S., “*Use of an elevated temperature and novobiocin in modified enzyme-linked immunoabsorbent assay for the improved recovery of Salmonella from foods*,” *J Food Prot*, vol. 55, no. 10, pp. 758–762, 1992.
 - [62] D. Jay, L.S., Comar, “*Comparative study of TECRA Salmonella Visual Immunoassay and Australian Standard cultural methods for analysis of salmonellaes in foods*,” *Food Technol Austr*, vol. 40, no. 5, pp. 186–191, 1988.
 - [63] B. G. Andrade, R. B., Gemelli, T., DALL, O. L., Cristina, K., Brito, T., Barboza, A. A. L., Brito, “*Métodos diagnósticos para os patógenos alimentares: Campylobacter sp., Salmonella sp. e Listeria monocytogenes*,” *Arq. do Inst. Biológico*, vol. 77, no. 4, pp. 741–750, 2010.
 - [64] S. L. Flowers, R.S.; Klatt, M.J.; Keelan, “*Visual immunoassay for detection of Salmonella in foods: collaborative study*,” *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, vol. 71, no. 5, pp. 973–980, 1988.
 - [65] A. D’Aoust, J.Y., Sewell, A., Jean, “*Limited sensitivity of short (6h) selective enrichment for detection of foodborne Salmonella*,” *J Food Prot*, vol. 53, no. 7, pp. 562–565, 1990.
 - [66] E. L. SUÍNA, “*ELISA indireto na detecção de Salmonella spp.*,” *Ciência Rural*, vol. 32, no. 6, 2002.
 - [67] M. G. Rall, V.L.M.; Rall, R.; Aragon, L.C.; Silva, “*Evaluation of three enrichment broths and five plating media for Salmonella detection in poultry*,” *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 36, no. 2, pp. 147–150, 2005.
 - [68] J. P. Coeuret, V. Dubernet, S. Bernardeau, M. Gueguen, M. Vernoux, “*Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products*,” *Lait*, vol. 83, pp. 269–306, 2003.
 - [69] The Editors of Encyclopædia Britannica, “*Lactobacillus*,” 2015. [Online]. Available: <https://www.britannica.com/science/Lactobacillus>. [Accessed: 10-May-2017].

- [70] Biomérieux, “API®.” [Online]. Available: <http://www.biomerieux-usa.com/clinical/api>. [Accessed: 10-May-2017].
- [71] ASAE, “*Clostridium*.” [Online]. Available: <http://www.asae.pt/?cn=541054135465AAAAAAAAAAAAA>. [Accessed: 25-May-2017].
- [72] McCane B. A., “*Clostridium perfringens*,” in *Food Microbiology – Fundamentals and Frontiers*., ASM Press, Ed. Washington, 1997, pp. 305–326.
- [73] L. Petit, M. Gibert, and M. R. Popoff, “*Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype,” *Trends Microbiol.*, vol. 7, no. 3, pp. 104–110, 1999.
- [74] S. Brynestad and P. E. Granum, “*Clostridium perfringens* and foodborne infections,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 74, no. 3, pp. 195–202, 2002.
- [75] R. K. Robinson, *Encyclopedia of food microbiology*. Academic press, 2014.
- [76] I. C. M. S. Food, “*Streptococcus*,” in *Microbiological Specifications of Food Pathogens*, Londres: Blackie Academic & Professional, 1996, pp. 334–338.
- [77] M. J. Gomes, “*Gênero Streptococcus spp.*,” *Favet-Universidade Fed. Do Rio Gd. Do Sul*, pp. 1–76, 2013.
- [78] M. I. Suhel, “*Streptococcus spp. e Aeromonas spp. na água e em tilápias do nilo (Oreochromis niloticus) e parâmetros físico-químicos da água de piscicultura em tanques-rede.*,” 2011.
- [79] J. D. N. F. D. Castro, “*Perfil de resistência de cepas de pseudomonas aeruginosa em três centros de saúde do Estado do RN (Master’s thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Norte).*,” Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2015.
- [80] K. Todar, “*Pseudomonas*,” *Web Review of Todar’s Online Textbook of Bacteriology*. “*The Good, the Bad, and the Deadly*”., 2012. [Online]. Available: http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas_2.html. [Accessed: 11-May-2017].
- [81] S. W. Ritchie, J. J. Hanway, and G. O. Benson, “*Como a planta de milho se desenvolve*,” *Encarte de informações agronômicas*, no. 103, pp. 1–20, 2003.
- [82] P. A. Counce, T. C. Keisling, and A. J. Mitchell, “*A uniform, objectives, and adaptive system for expressing rice development*,” *Crop Sci.*, vol. 40, no. 2, pp. 436–443, 2000.
- [83] C. Guevara, P. Alegre-rs, F. Cap, R. Agr, G. Gestor, and A. Ecol, “*Proposta para a produção de arroz ecológico a partir de estudos de caso no RS e PR Proposal to ecological rice production from case studies in RS and PR .*,” pp. 161–177, 2013.
- [84] P. N. Figueiredo, R. Menino, A. Prazeres and J. C. Fareleira, A. Vargues, C. Carranca, P. Marques, J. Pereira, P. Goufo, H. Trindade, J. Carneiro, N. Couto, E. Mateus, A. Ribeiro, “*O cultivo do arroz e a resposta do agrossistema às alterações ambientais de temperatura e dióxido de carbono*,” *Vida Rural*, pp. 28–31, 2013.
- [85] P. P. and P. A. Reynaud, “*Do cyanobacteria enhance germination and growth of rice?*,” *Plant Soil* 10, pp. 235–240, 1987.
- [86] S. Yoshida, *Fundamentals of rice crop science*. IRRI, 1981.
- [87] “*Características morfológicas*.” [Online]. Available: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000fe75wint02wx5eo07qw4xeclyg>

dut.html.

- [88] A. P. Mayer, A.M.; Mayber, *The germination of seeds.*, 2nd ed. New York, 1975.
- [89] A. M. and M. M. Kaneko M., Itoh H., Ueguchi-Tanaka M., “*The α -amylase induction in endosperm during rice seed germination is caused by gibberellins synthesized in epithelium.*,” *Plant Physiol.*, vol. 128, no. 4, pp. 1264–1270, 2002.
- [90] F. GB., “*Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains.*,” *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, vol. 40, pp. 305–345, 1989.
- [91] Codex Alimentarius Commission, *Proposed draft standard for rice*. Rome, 1990.
- [92] T. Arroz, “*O grão de arroz.*” [Online]. Available: http://www.ufrgs.br/alimentus1/terradearroz/grao/gr_esquema_popup.htm. [Accessed: 10-May-2017].
- [93] J. I. W. Wayne E Marshall, *Rice science and technology*. CRC Press, 1993.
- [94] B. O. del Rosario, A.R., Briones, V.P., Vidal, A.J. & Juliano, “*Composition and endosperm structure of developing and mature rice kernel.*,” *Cereal Chem.*, no. 45, pp. 225–235, 1968.
- [95] D. Shu, X., Sun, J.Wu, “*Effects of Grain Development on Formation of Resistant Starch in Rice.*,” *Food Chem.*, vol. 164, pp. 89–97, 2014.
- [96] N. Champ, M.; Faisant, “*Resistant starch: analytical and physiological aspects.*,” *Bol SBCTA*, vol. 30, no. 1, pp. 37–43, 1996.
- [97] L. F. Polesi, D. C. Lima, P. G. Morais, I. Cristina, and F. Romo, “*Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial Caracterização físico-química , funcional e nutricional de duas cultivares brasileiras de arroz physicochemical , functional and nutritional.*,” vol. 2011, no. September 2016, pp. 1262–1273, 2014.
- [98] M. Walter, “*Amido resistente : metodologias de quantificação e resposta biológica em ratos.*,” pp. 1–104, 2005.
- [99] D. F. Birt *et al.*, “*Resistant Starch: Promise for Improving Human Health.*,” *Adv. Nutr. An Int. Rev. J.*, vol. 4, no. 6, pp. 587–601, Nov. 2013.
- [100] C. C. Denardin and L. P. Da Silva, “*Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas.*,” *Ciência Rural*, vol. 39, no. 3, pp. 945–954, 2009.
- [101] O. G. Christopher, “*Towards an understanding of starch granule structure and hydrolysis.*,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 8, no. 11, pp. 375–382, 1997.
- [102] J. . D. G.E Vandeputtea, V Deryckea, J Geeromsb, “*Rice starches. II. Structural aspects provide insight into swelling and pasting properties.*,” *J. Cereal Sci.*, vol. 38, no. 1, pp. 53–59, 2003.
- [103] K. Frei, M., Siddhuraju, P.Becker, “*Studies on the in Vitro Starch Digestibility and the Glycemic Index of Six Different Indigenous Rice Cultivars from the Philippines.*,” *Food Chem.*, vol. 83, no. 3, pp. 395–402, 2003.
- [104] A. R. A. Soares, “*Caracterização De Variedades De Arroz - Aspetos Nutricionais.*,” Aveiro, 2014.
- [105] G. M. & H. Englyst, “*Starch utilization by the human large intestinal microflora.*,” *J Appl Bacteriol*, vol. 60, pp. 195–201, 1986.
- [106] et al Hill, C., Guarner, F., Reid, G., “*Expert consensus docu- ment: the International Scientific*

- Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic.*,” *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, vol. 11, pp. 506–514, 2014.
- [107] a R. Bird, I. L. Brown, and D. L. Topping, “*Starches, resistant starches, the gut microflora and human health.*,” *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, vol. 1, no. 1, pp. 25–37, 2000.
- [108] P. Escudero, Á., E., González, S., “*La fibra dietética.*,” *Nutr. Hosp.*, vol. 21, no. 2, pp. 61–72, 2006.
- [109] M. B. Gibson, G.R., Roberfroid, “*Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics.*,” *J. Nutr.*, vol. 125, pp. 1401–1412, 1995.
- [110] A. A. Wani, P. Singh, M. A. Shah, U. Schweiggert-Weisz, K. Gul, and I. A. Wani, “*Rice starch diversity: effects on structural, morphological, thermal, and physicochemical properties-a review.*,” *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 11, no. 5, pp. 417–436, 2012.
- [111] OECD (Organisationfor Economic Co-operation and Development), “*Series on the Safety of Novel Foods and Feeds, No.10: Consensus document on compositional considerations for new varieties of rice (Oryza sativa): Key food and feed nutrients and anti-nutrients.*,” no. ENV/JM/MONO(2004)15, p. 38, 2004.
- [112] P. Dinesh Babu, R. S. Subhasree, R. Bhakayaraj, and R. Vidhyalakshmi, “*Brown Rice-Beyond the Color Reviving a Lost Health Food -A Review.*,” *Am. J. Agron.*, vol. 2, no. 2, pp. 67–72, 2009.
- [113] S. Tian, K. . Nakamura, and H. K. Kayahara, “*Analysis of phenolic compounds in white rice, brown rice.*,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, pp. 4808–4813, 2004.
- [114] R. E. Oste, “*Digestibility of processed food protein.*,” *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 289, pp. 371–388, 1991.
- [115] G. C. Panatda Jannoey, Hataichanoke Niamsup, Saisamorn Lumyong, Toshisada Suzuki, Takeshi Katayama, “*Comparison of gamma-aminobutyric acid production in Thai ricegrains.*,” *World J Microbiol Biotechnol*, vol. 26, pp. 257–263, 2010.
- [116] I. T. Morita H , Uno Y , Umemoto T , Sugiyama C , Matsumoto M , Wada Y , “*Effect of gamma-aminobutyric acid-rich germinated brown rice on indexes of life-style related diseases.*,” *Nippon Ronen Igakkai Zasshi.*, vol. 41, no. 2, pp. 211–216, 2004.
- [117] O. N. Kanokkan Panchan, “*Effect of pre-germination and parboiling on brown rice properties.*,” *Asian J. Food Agro-Industry*, vol. 2, no. 4, pp. 515–524, 2009.
- [118] S. Chavan, JK Kadam, “*Nutritional improvement of cereals by sprouting.*,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 28, no. 5, pp. 401–437, 1989.
- [119] J. Xu, H. Zhang, X. Guo, and H. Qian, “*The impact of germination on the characteristics of brown rice flour and starch.*,” *J. Sci. Food Agric.*, vol. 92, no. 2, pp. 380–387, 2011.
- [120] P. Zheng, Y. M., He, R. G., Huang, X., Zheng, L., Hu, Q. L., Hua, “*Effects of germination on composition of carbohydrate and activity of relevant enzymes in different varieties of brown rice.*,” *Cereal Feed Ind.*, vol. 5, pp. 1–3, 2006.
- [121] N. Komatsuzaki, K. Tsukahara, H. Toyoshima, T. Suzuki, N. Shimizu, and T. Kimura, “*Effect of soaking and gaseous treatment on GABA content in germinated brown rice.*,” *J. Food Eng.*, vol. 78, no. 2, pp. 556–560, 2007.
- [122] M. Diana, M. Quílez, J. Rafecas, “*Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: a*

- review.,” *J. Funct. Foods*, vol. 10, pp. 497–420, 2014.
- [123] E. P. Palmiano and B. O. Juliano, “Biochemical Changes in the Rice Grain during Germination.,” *Plant Physiol.*, vol. 49, no. 5, pp. 751–756, 1972.
- [124] D. Karladee and S. Suriyong, “ γ -Aminobutyric acid (GABA) content in different varieties of brown rice during germination,” *ScienceAsia*, vol. 38, no. 1, pp. 13–17, 2012.
- [125] K. T. P. Luangpituksa, W. Varanyanond, and C. Hansawasdi, “GABA (γ -aminobutyric acid) production, antioxidant activity in some germinated dietary seeds and the effect of cooking on their GABA content,” *Food Sci. Technol.*, 2016.
- [126] R. Dhakal, V. K. Bajpai, and K. H. Baek, “Production of GABA (gamma-aminobutyric acid) by microorganisms: A review,” *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 43, no. 4, pp. 1230–1241, 2012.
- [127] J. Taneera *et al.*, “ γ -Aminobutyric acid (GABA) signalling in human pancreatic islets is altered in type 2 diabetes,” *Diabetologia*, vol. 55, no. 7, pp. 1985–1994, 2012.
- [128] N. Soltani *et al.*, “GABA exerts protective and regenerative effects on islet beta cells and reverses diabetes.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 28, pp. 11692–7, 2011.
- [129] P. Jannoey, H. Niamsup, S. Lumyong, S. Tajima, M. Nomura, and G. Chairrote, “ γ -aminobutyric acid (GABA) accumulations in rice during germination,” *Chiang Mai J. Sci.*, vol. 37, no. 1, pp. 124–133, 2010.
- [130] O. Chan-Ho, Oh Suk-Heung, “Effects of Germinated Brown Rice Extracts with Enhanced Levels of GABA on Cancer Cell Proliferation and Apoptosis,” *J. Med. Food*, vol. 7, no. 1, pp. 19–23, 2004.
- [131] M. Y. Roohinejad, S. Omidizadeh, A. Mirhosseini, H. Saari, N. Mustafa, S. Mohd Yusof, R. Meor Hussin, A. S. Hamid, A. Abd Manap, “Effect of pre-germination time of brown rice on serum cholesterol levels of hypercholesterolaemic rats.,” *J. Sci. Food Agric.*, vol. 90, pp. 245–251, 2010.
- [132] S. Thitinunsomboon, S. Keeratipibul, and A. Boonsiriwit, “Enhancing gamma-aminobutyric acid content in germinated brown rice by repeated treatment of soaking and incubation.,” *Food Sci. Technol. Int.*, vol. 19, no. February 2013, pp. 25–33, 2013.
- [133] L. (Zhang, Q., Xiang, J., Zhang, L., Zhu, X., Evers, J., van der Werf, W., Duan, “Optimizing soaking and germination conditions to improve gamma-aminobutyric acid content in japonica and indica germinated brown rice.,” *J. Funct. Foods*, vol. 10, pp. 283–291, 2014.
- [134] J. Ou, K., Cheng, Y., Xing, Y., Lin, L., Nout, R., Liang, “Phytase activity in brown rice during steeping and sprouting.,” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 48, pp. 598–603, 2011.
- [135] S. Ding, J., Zhou, Q., Yang, T., Dong, M., Zhang, L., Xiong, “Effects of low temperature and low oxygen storage on γ -aminobutyric acid content of brown rice during germination.,” *J. Chinese Cereal. Oils Assoc.*, vol. 30, pp. 1–19, 2015.
- [136] H. S. Kim, H. Y., Hwang, I. G., Kim, T. M., Woo, K. S., Park, D. S., Kim, J. H., Kim, D. J., Lee, J., Lee, Y. R., Jeong, “Chemical and functional components in different parts of rough rice (*Oryza sativa* L.) before and after germination.,” *Food Chem.*, vol. 134, pp. 288–293, 2012.
- [137] H. Bouché, N., & Fromm, “GABA in plants: Just a metabolite?,” *Trends Plant Sci.*, vol. 9, no. 3, pp. 110–115, 2004.
- [138] I. Ohtsubo, S., Asano, S., Sato, K., & Matsumoto, “Enzymatic production of γ -aminobutyric acid

- using rice (*Oryza sativa*) germ,” *Food Sci. Technol. Res.*, vol. 6, no. 3, pp. 208–211, 2000.
- [139] H. S. Kim, E. J. Lee, S. T. Lim, and J. A. Han, “Self-enhancement of GABA in rice bran using various stress treatments,” *Food Chem.*, vol. 172, pp. 657–662, 2015.
- [140] W. Liu, S. Willet, “Dietary carbohydrates,” *UpToDate*. [Online]. Available: <https://store.utdol.com/app/index.asp>. [Accessed: 28-Mar-2017].
- [141] F. Menezes, EW. Lajolo, “Seminário índice Glicêmico en Salud y Alimentación Humana,” 2003.
- [142] A. Sahyoun, NR. Anderson, AI. Kanaya, “Dietary glycemic index and load, measures of glucose metabolism, and body fat distribution in older adults,” *Am J Clin Nutr.*, vol. 82, no. 3, pp. 547–52, 2005.
- [143] C. Augustin, LS. Franceschu, S. Jenkins, DJ. Kendall, “Glycemic index in chronic disease: a review,” *Eur J Clin Nutr.*, vol. 56, no. 11, pp. 1049–71, 2002.
- [144] D. Hu, P. Zhao, H. Duan, Z. Linlin, Z. Wu, “Starch digestibility and the estimated glycemic score of different types of rice differing in amylose contents,” *J. Cereal Sci.*, vol. 40, no. 3, pp. 231–237, 2004.
- [145] E. Björck, I. Liljeberg, H. Östman, “Low glycaemic-index foods,” *Br. J. Nutr.*, vol. 83, no. 1, pp. 149–155, 2000.
- [146] F. M. Silva, T. Steemburgo, M. J. de Azevedo, and V. D. F. de Mello, “Papel do índice glicêmico e da carga glicêmica na prevenção e no controle metabólico de pacientes com diabetes melito tipo 2,” *Arq. Bras. Endocrinol Met.*, vol. 53, no. 5, pp. 560–571, 2009.
- [147] M. S. Dos Santos, “Índice glicêmico: Importância e aplicação clínica,” Universidade REGIONAL do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – Unijuí, 2011.
- [148] J. Foster-Powell, K. Holt, S. Brand-Miller, “International table of glycemic index and glycemic load values: 2002,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 76, no. 1, pp. 5–56, 2002.
- [149] J. Brand-Miller, S. Hayne, P. Petocz, and S. Colagiuri, “Low-Glycemic Index Diets in the Management of Diabetes,” *Diabetes Care*, vol. 26, no. 8, p. 2261 LP-2267, Jul. 2003.
- [150] G. Wolever, M., Jenkins, J., Jenkins, L., Josse, “The glycemic index: methodology and clinical implications,” *Am. Soc. Clin. Nutr.*, vol. 54, no. 5, pp. 846–854, 1991.
- [151] APDP, “O que é a Diabetes?,” *Diabetes*. [Online]. Available: <http://www.apdp.pt/diabetes/a-pessoa-com-diabetes/o-que-e-a-diabetes#a-diabetes>. [Accessed: 15-May-2017].
- [152] N. M. Delzenne, P. D. Cani, A. Everard, A. M. Neyrinck, and L. B. Bindels, “Gut microorganisms as promising targets for the management of type 2 diabetes,” *Diabetologia*, vol. 58, no. 10, pp. 2206–2217, 2015.
- [153] A. V Hartstra, K. E. C. Bouter, F. Bäckhed, and M. Nieuwdorp, “Insights Into the Role of the Microbiome in Obesity and Type 2 Diabetes,” *Diabetes Care*, vol. 38, no. 1, p. 159 LP-165, Dec. 2014.
- [154] B. L. Miller JB, Pang E, “Rice: a high or low glycemic index food?,” *Am J Clin Nutr.*, vol. 56, no. 6, pp. 1034–6, 1992.
- [155] A. S. T. S.L., “Statistic analyser S21.” .
- [156] K. Science of sensing, “Instant whiteness tester rice and rice powder,” 2011.

- [157] F. de ciência e tecnologia Cientec, “Kett, graus de brancura kett,” *Kett, graus de brancura kett*. [Online]. Available: <http://www.cientec.rs.gov.br/?model=conteudo&menu=234&id=1751>. [Accessed: 19-Jan-2017].
- [158] R. a. M. B. Booth, *RVA Handbook*, 4th ed. United States of America, 2007.
- [159] A. International, *Approved Methods of Analysis*, 11th ed. St. Paul, 1999.
- [160] A. I. Method, *Determination of the Pasting Properties of Rice with the Rapid Visco Analyser Final*. 1999.
- [161] I. S. Organization, “Iso 6647-2:2007 - Rice - Determination of Amylose Content - Part 2: Routine Method.,” 2007.
- [162] F. Goñi, I., Garcia-Alonso, A., Saura-Calixto, “A Starch Hydrolysis Procedure to Estimate Glycemic Index.,” *Nutr. Res.*, vol. 17, no. 3, pp. 427–437, 1997.
- [163] I. 4833., *Microbiology 304 of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of microorganisms-Colony-count technique at 30 degrees C*. Geneva, 2003.
- [164] A. 16140 B. 12/13-02/05, “*Escherichia coli* - Determinação quantitativa pela técnica de contagem (UFC ou NMP). (TEMPO/bioMérieux).”
- [165] ISO 7932:2004, *Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of presumptive Bacillus cereus -- Colony-count technique at 30 degrees C*. Geneva, 2004.
- [166] A. ART-27/01-12/05, “*Rapidyme Salmonella*.”
- [167] N. E. I. 16140, *Microbiology of food and animal feeding stuffs. Protocol for the validation of alternative methods*. Geneva, 2003.
- [168] ISO 21527-1 (2008)., *Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds-Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0.95*. Geneva, 2008.
- [169] G. Y. Kirimliolu, Y. Yazan, and K. Erol, “Gamma-aminobutyric acid loaded halloysite nanotubes and in vitro-in vivo evaluation for brain delivery,” *Int. J. Pharm.*, vol. 495, no. 2, pp. 816–826, 2015.
- [170] “Decreto-Lei N.º63/2000 De 19 De Abril ‘D.R. I Série a’ N.º93.,” *Diário da República*, 2000. .
- [171] X. Kong, P. Zhu, Z. Sui, and J. Bao, “Physicochemical properties of starches from diverse rice cultivars varying in apparent amylose content and gelatinisation temperature combinations,” *Food Chem.*, vol. 172, pp. 433–440, 2015.
- [172] E. Comissão, “Arroz,” *Classificação da dimensão dos grãos de arroz*, 2017. [Online]. Available: http://exporthelp.europa.eu/thdapp/display.htm?page=re/re_Arroz.html&docType=main&languageId=PT#Classificacao_da_dimensao_PT. [Accessed: 02-May-2017].
- [173] J. Tong, C., Chen, Y., Tang, F., Xu, F., Huang, Y., Chen, H. Bao, “Genetic Diversity of Amylose Content and Rva Pasting Parameters in 20 Rice Accessions Grown in Hainan, China.,” *Food Chem.*, vol. 161, pp. 239–245, 2014.
- [174] G. M. SUI Jiong-ming, LI Xin, YAN Song, YAN Chang-jie, ZHANG Rong, TANG Shu-zhu, LU Ju-fei, CHEN Zong-xiang, “Studies on the Rice RVA Profile Characteristics and Its Correlation with the Quality,” *Sci. Agric. Sin.*, 2005.

- [175] M. H. Asmeda, R., Noorlaila, A. Norziah, “*Relationships of Damaged Starch Granules and Particle Size Distribution with Pasting and Thermal Profiles of Milled Mr263 Rice Flour.*,” *Food Chem.*, vol. 191, p. 45–51., 2016.
- [176] C. J. Chen, M.-H. Bergman, “*Method for Determining the Amylose Content, Molecular Weights, and Weight- and Molar-Based Distributions of Degree of Polymerization of Amylose and Fine-Structure of Amylopectin.*,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 69, no. 3, pp. 562–578, 2007.
- [177] C. A. A. Denardin, C. C., Walter, M., Da Silva, L. P., Souto, G. D. Fagundes, “*Effect of Amylose Content of Rice Varieties on Glycemic Metabolism and Biological Responses in Rats.*,” *Food Chem.*, vol. 105, no. 4, pp. 1474–1479, 2007.
- [178] M. S. Goddard, G. Young, and R. Marcus, “*The effect of amylose content on insulin and glucose responses to ingested rice.*,” *Am. J. Clin. Nutr.* , vol. 39, no. 3, pp. 388–392, Mar. 1984.
- [179] E. Hallström, F. Sestili, D. Lafiandra, I. Björck, and E. Östman, “*A novel wheat variety with elevated content of amylose increases resistant starch formation and may beneficially influence glycaemia in healthy subjects.*,” *Food Nutr. Res.*, vol. 55, p. 10.3402/fnr.v55i0.7074, Aug. 2011.
- [180] P. Srikaeo, K. Arranz-Martínez, “*Formulating Low Glycaemic Index Rice Flour to Be Used as a Functional Ingredient.*,” *J. Cereal Sci.*, vol. 61, pp. 33–40, 2015.
- [181] L. N. Panlasigui and L. U. Thompson, “*Blood glucose lowering effects of brown rice in normal and diabetic subjects.*,” *Int. J. Food Sci. Nutr.*, vol. 57, no. 3–4, pp. 151–158, Jan. 2006.
- [182] Y. Granfeldt, A.-C. Eliasson, and I. Björck, “*An Examination of the Possibility of Lowering the Glycemic Index of Oat and Barley Flakes by Minimal Processing.*,” *J. Nutr.* , vol. 130, no. 9, pp. 2207–2214, Sep. 2000.
- [183] FAO, “*Oryza sativa.*” [Online]. Available: <http://www.fao.org/ag/icons/plant.gif>.
- [184] A. D. Oro, T., Limberger, V. M., Miranda, M. Z. D., Richards, N. S. P. D. S., Gutkoski, L. C., Francisco, “*Pasting properties of whole and refined wheat flour blends used for bread production.*,” *Ciência Rural*, vol. 43, no. 4, pp. 754–760, 2013.

8. Anexos

8.1. Determinação GABA por IC-UV/ VIS

A determinação do conteúdo de GABA por IC-UV/VIS é quantitativa e é um método analítico por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta (UV) e visível (VIS), recorrendo ao *Agilent DAD 8453* a temperatura ambiente.

As experiências no HPLC foram realizadas no sistema de cromatografia líquida Ecom com um gradiente de bombeamento de Beta 10, válvula de injeção com 10 mL, um detetor de absorvância LCD 2084 e uma câmara de mistura. A detecção UV foi realizada a um comprimento de onda de 230 nm. As análises foram efetuadas numa pré-coluna *LiChroCART STAR RP-18e*. Os cromatogramas foram avaliados com o programa *Clarity 2.6.6*. A fase móvel otimizada foi constituída por metanol e solução tampão acetato. A taxa de fluxo foi de 0.5 mL/min e as amostras foram dissolvidas na fase móvel.

No sistema de derivatização da pós-coluna o tamanho das partículas foi determinado por TEM (*transmission electron microscopy*). Como reator foi utilizada uma pré-coluna modificada. Esta pré-coluna foi primeiro esvaziada e depois enchida com um agente de derivatização desidratante e colocado após a coluna de separação com um suporte de coluna. A capacidade deste reator foi testada com solução EDTA (1 mM, 720 mL) durante 24 horas numa taxa de fluxo de 0.5 mL/min.

De modo a testar a sensibilidade do teste foi realizada uma curva de calibração. Esta curva é efetuada com a concentração de $1.0 \cdot 10^{-2}$ mol/L. Cada calibração é realizada a diferente pH, uma a 5.5 e outra a 7.0.

Para se analisar o efeito da taxa de fluxo insere-se L-Serina ($2.0 \cdot 10^{-3}$ mol/L) e fase móvel que consiste em metanol e 20 mM de tampão acetato, com pH igual a 5.5.

O estudo da eficiência da derivatização é realizado no HPLC, com a remoção da coluna de separação e do reator, e a bomba do HPLC foi ligada diretamente ao detetor UV-VIS. Além disso, foram adicionadas soluções de L-Serina (1 mM), com diferentes concentrações de CuSO_4 , com a proporção 0.05-0.5, respetivamente. Os valores foram determinados com pH a 5.5 e 7.0, e com uma taxa de fluxo de 0.5 mL/min.

8.2. Características físicas

Amostra	Comprimento (mm)	Largura (mm)	Comprimento/Largura	Kett
Indica 7-G	6,471	1,905	3,397	35,500
Indica 7-T	6,613	1,948	3,395	20,500
Japonica 16-G	5,299	2,634	2,012	23,600
Japonica 16-T	5,317	2,634	2,019	20,500

Amostra	Brancura vítrea	Brancura total	Área gessada (%)
Indica 7-G	126,220	144,180	8,03
Indica 7-T	116,020	119,340	1,84
Japonica 16-G	118,590	128,160	16,28
Japonica 16-T	109,510	110,670	1,84

8.3. Perfil viscosidade

Amostra	Pico (cP)	Vala (cP)	Breakdown (cP)
Indica 7-G	547,5±0,71	551±2,12	-5±1,41
Indica 7-T	424±87,68	428±87,97	-4±0,71
Japonica 16-G	1324,5±13,44	1270±22,63	45,5±3,54
Japonica 16-T	1217±63,64	855±70,71	362±7,07

Amostra	Viscosidade Final (cP)	Retrogradação (cP)	Tempo do Pico (min)	Pasting Temperature (°C)
Indica 7-G	1290±2,83	737±1,41	7±0	93,8±0,14
Indica 7-T	1444±195,87	1020±108,19	7±0	95±0,14
Japonica 16-G	2260±25,46	945,5±2,12	6,2335±0,33	91,725±0,04
Japonica 16-T	1686±84,85	469±21,21	6,0333±0,05	90,2±0

8.4. Características químicas

Amostras	Humidade (%)	Humidade (%) 1 hora imersão	Amido total (%)	Amido total (%) 1 hora imersão
Indica 7-G	16,23868746	19,18668684	40,171±2,34	75,467±0,38
Indica 7-T	14,39973563	33,76351998	59,137±1,60	67,664±1,96
Japonica 16-G	15,59824965	17,54680282	74,308±1,21	57,989±0,64
Japonica 16-T	14,12145098	20,81619247	63,882±0,97	72,082±0,02

Amostras	Amido resistente (%)	Amido resistente (%) 1 hora imersão	Amilose (%)	Amilose (%) 1 hora imersão
Indica 7-G	10,004±0,15	7,018±0,38	23,185±0,08	23,941±1,08
Indica 7-T	11,271±0,24	6,738±1,19	23,100±0,63	29,188±1,11
Japonica 16-G	9,313±1,61	7,784±1,07	19,371±1,03	18,180±2,55
Japonica 16-T	8,301±0,68	4,950±0,01	23,602±0,55	22,014±1,88

8.5. Índice glicémico

Amostras	Índice glicémico	Índice glicémico 1 hora imersão
Indica 7-G	82,04±1,23	64,11±0,80
Indica 7-T	73,17±0,05	65,89±2075
Japonica 16-G	54,07±0,66	73,22±0,26
Japonica 16-T	76,55±1,41	66,63±0,52

8.6. Conteúdo em GABA

Amostra	GABA (mg/kg)
Indica 7-G	0,084
Indica 7-T	0,050
Japonica 16-G	0,100
Japonica 16-T	0,050

8.7. Caracterização microbiana

	Sem imersão (UFC/ g)	Imersão 1 hora (UFC/ g)	Germinação (UFC/ g)
Quantificação de Microrganismos a 30°C	1.0x44 ²	1.0x54 ³	>1.0x49 ⁵
Quantificação de Enterobacteriaceae	<1.0x10 ¹	1.0x83 ²	>1.0x49 ⁴
Quantificação de <i>Escherichia coli</i>	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹
Quantificação de <i>Bacillus cereus</i>	<1.0x50 ¹	<1.0x50 ¹	<1.0x50 ¹
Quantificação de Bolores	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹
Quantificação de Leveduras	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹
Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	0	0	0

8.8. Correlação entre características

Variável	
H	Humidade (%)
H1	Humidade com uma hora de imersão (%)
AT	Amido total (%)
AT1	Amido total com uma hora de imersão (%)
AR	Amido resistente (%)
AR1	Amido resistente com uma hora de imersão (%)
AM	Amilose (%)
AM1	Amilose com uma hora de imersão (%)
IG	Índice glicémico
IG1	Índice glicémico com uma hora de imersão
GABA	GABA (mg/Kg)
GABA1	GABA com uma hora de imersão (mg/Kg)
M30	Microrganismos a 30°C (UFC/g)
E	Enterobacteriaceae (UFC/g)

BC	<i>Bacillus cereus</i> (UFC/g)
EC	<i>Escherichia coli</i> (UFC/g)
LB	Leveduras e bolores (UFC/g)
S	<i>Salmonella</i> spp. (UFC/g)
M30 1	Microrganismos a 30°C com uma hora de imersão (UFC/g)
E 1	Enterobacteriaceae com uma hora de imersão (UFC/g)
BC 1	<i>Bacillus cereus</i> com uma hora de imersão (UFC/g)
EC 1	<i>Escherichia coli</i> com uma hora de imersão (UFC/g)
LB 1	Leveduras e bolores com uma hora de imersão (UFC/g)
S 1	<i>Salmonella</i> spp. Com uma hora de imersão (UFC/g)
M30 G	Microrganismos a 30°C após germinação (UFC/g)
E G	Enterobacteriaceae após germinação (UFC/g)
BC G	<i>Bacillus cereus</i> após germinação
EC G	<i>Escherichia coli</i> após germinação
LB G	Leveduras e bolores após germinação
S G	<i>Salmonella</i> spp. após germinação

Correlação de Pearson
Muito fraca: $0 < r < 0.19$
Fraca: $0.2 < r < 0.39$
Moderada: $0.40 < r < 0.59$
Forte: $0.60 < r < 0.79$
Muito forte: $0.80 < r < 1.0$

Variável	H	H1	AT	AT1	AR	AR1
H	1,0000					
H1	-0,4275	1,0000				
AT	-0,5256	0,3079	1,0000			
AT1	-0,0078	-0,2342	0,1582	1,0000		
AR	-0,1364	-0,0967	0,2443	-0,0858	1,0000	
AR1	0,1320	-0,4246	0,0497	-0,1394	0,4573	1,0000
AM	-0,2417	0,3432	-0,0939	-0,4478	-0,0219	0,1880

AM1	-0,3145	0,3950	-0,0220	-0,3529	0,3637	0,2156
IG	0,0925	0,0466	-0,4108	0,3193	-0,3569	-0,3661
IG1	-0,3407	0,1257	0,1489	-0,3915	0,3297	0,0941
GABA	-0,0935	0,2160	0,0646	-0,0442	-0,3227	-0,3324
GABA1	-0,0924	0,2307	0,0698	-0,0329	-0,3196	-0,3333
M30	-0,0709	0,0254	0,0010	-0,1201	-0,2400	-0,2135
E	-0,0709	0,0254	0,0010	-0,1201	-0,2400	-0,2135
BC	-0,0709	0,0254	0,0010	-0,1201	-0,2400	-0,2135
EC	-0,0709	0,0254	0,0010	-0,1201	-0,2400	-0,2135
LB	-0,0709	0,0254	0,0010	-0,1201	-0,2400	-0,2135
S	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
M30 1	-0,0709	0,0254	0,0010	-0,1201	-0,2400	-0,2135
E 1	-0,0709	0,0254	0,0010	-0,1201	-0,2400	-0,2135
BC 1	-0,0709	0,0254	0,0010	-0,1201	-0,2400	-0,2135
EC 1	-0,0709	0,0254	0,0010	-0,1201	-0,2400	-0,2135
LB 1	-0,0709	0,0254	0,0010	-0,1201	-0,2400	-0,2135
S 1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
M30 G	-0,0709	0,0254	0,0010	-0,1201	-0,2400	-0,2135
E G	-0,0709	0,0254	0,0010	-0,1201	-0,2400	-0,2135
BC G	-0,0709	0,0254	0,0010	-0,1201	-0,2400	-0,2135
EC G	-0,0709	0,0254	0,0010	-0,1201	-0,2400	-0,2135
LB G	-0,0709	0,0254	0,0010	-0,1201	-0,2400	-0,2135
S G	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Variável	AM	AM1	IG	IG1	GABA	GABA1
AM	1,0000					
AM1	0,7749	1,0000				
IG	0,0307	0,1133	1,0000			
IG1	0,2946	0,0593	-0,2870	1,0000		
GABA	-0,1248	-0,0015	0,0619	-0,0406	1,0000	
GABA1	-0,1092	0,0304	0,0829	-0,0591	0,9961	1,0000
M30	-0,2096	-0,2576	-0,1282	0,1219	0,6990	0,6329
E	-0,2096	-0,2576	-0,1282	0,1219	0,6990	0,6329
BC	-0,2096	-0,2576	-0,1282	0,1219	0,6990	0,6329
EC	-0,2096	-0,2576	-0,1282	0,1219	0,6990	0,6329
LB	-0,2096	-0,2576	-0,1282	0,1219	0,6990	0,6329
S	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
M30 1	-0,2096	-0,2576	-0,1282	0,1219	0,6990	0,6329
E 1	-0,2096	-0,2576	-0,1282	0,1219	0,6990	0,6329
BC 1	-0,2096	-0,2576	-0,1282	0,1219	0,6990	0,6329
EC 1	-0,2096	-0,2576	-0,1282	0,1219	0,6990	0,6329

LB 1	-0,2096	-0,2576	-0,1282	0,1219	0,6990	0,6329
S 1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
M30 G	-0,2096	-0,2576	-0,1282	0,1219	0,6990	0,6329
E G	-0,2096	-0,2576	-0,1282	0,1219	0,6990	0,6329
BC G	-0,2096	-0,2576	-0,1282	0,1219	0,6990	0,6329
EC G	-0,2096	-0,2576	-0,1282	0,1219	0,6990	0,6329
LB G	-0,2096	-0,2576	-0,1282	0,1219	0,6990	0,6329
S G	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Variável	M30	E	BC	EC	LB	S
M30	1,0000					
E	1,0000	1,0000				
BC	1,0000	1,0000	1,0000			
EC	1,0000	1,0000	1,00	1,0000		
LB	1,0000	1,0000	1,00	1,0000	1,0000	
S	0	0	0	0	0	1,0000
M30 1	1,0000	1,0000	1,00	1,0000	1,0000	1,0000
E 1	1,0000	1,0000	1,00	1,0000	1,0000	1,0000
BC 1	1,0000	1,0000	1,00	1,0000	1,0000	1,0000
EC 1	1,0000	1,0000	1,00	1,0000	1,0000	1,0000
LB 1	1,0000	1,0000	1,00	1,0000	1,0000	1,0000
S 1	0	0	0	0	0	0
M30 G	1,0000	1,0000	1,00	1,0000	1,0000	1,0000
E G	1,0000	1,0000	1,00	1,0000	1,0000	1,0000
BC G	1,0000	1,0000	1,00	1,0000	1,0000	1,0000
EC G	1,0000	1,0000	1,00	1,0000	1,0000	1,0000
LB G	1,0000	1,0000	1,00	1,0000	1,0000	1,0000
S G	0	0	0	0	0	0

Variável	M30 G	E G	BC G	EC G	LB G	S G
M30 G	1,0000					
E G	1,0000	1,0000				
BC G	1,0000	1,00	1,0000			
EC G	1,0000	1,00	1,0000	1,0000		
LB G	1,0000	1,00	1,0000	1,00	1,0000	
S G	0	0	0	0	0	1,0000

Variável	M30 1	E 1	BC 1	EC 1	L B 1	S 1
M30 1	1,0000					
E 1	1,0000	1,0000				
BC 1	1,0000	1,0000	1,0000			
EC 1	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		
LB 1	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	
S 1	0	0	0	0	0	1,0000
M30 G	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
E G	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
BC G	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
EC G	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
LB G	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
S G	0	0	0	0	0	0